

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke)
Sektion für Rheumatologie und Klinische Immunologie
Leiter: Prof. Dr. med. Hendrik Schulze-Koops

Die Rolle von T-Zellen in der Pathogenese autoimmuner Arthritiden

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi für das Fach Innere Medizin
an der
Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dr. med. Jan Leipe
(2021)

Fachmentorat:

Prof. Dr. Hendrik Schulze-Koops (Vorsitz)

Prof. Dr. med. Stephan Brand

Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Referenzen	16
2.1. Habilitationsrelevante Referenzen/ Publikationen	16
2.2. Weitere eigene relevante Referenzen/ Publikationen	17
3. Danksagung	19

1. Zusammenfassung

Autoimmune Arthritiden, wie die rheumatoide Arthritis (RA), sind chronische, systemisch-entzündliche Erkrankungen, die durch persistierend gesteigerte immunologische Aktivität, eine Reihe von systemischen Manifestationen sowie durch lokale Gelenkdestruktion mit der Folge zunehmender Behinderung gekennzeichnet sind. Obgleich die Pathophysiologie autoimmuner Arthritiden noch nicht vollständig geklärt ist, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass CD4-T-Zellen, die auch als T-Helfer-(Th-)Zellen bezeichnet werden, bei der Entstehung und Perpetuation der Autoimmunantwort von wesentlicher Bedeutung sind. (Leipe et al. 2009) Die wichtigsten Argumente für die pathogenetische Rolle von CD4-T-Zellen aus humanen *in vitro*, *ex vivo* und genetischen Analysen sind aktivierte „Memory“-CD4-T-Zellen im peripheren Blut, in der Synovialflüssigkeit und der Synovialmembran, das Vorhandensein von autoreaktiven T-Zellen und die Assoziation von bestimmten HLA-DR-Subtypen – deren einzige Funktion die Antigenpräsentation an T-Zellen ist – mit aggressiven Formen der Arthritis. (Leipe et al. 2015) Klinisch lässt sich die zentrale Rolle von T-Zellen einerseits anhand des therapeutischen Erfolgs der T-Zell-Kostimulationsblockade (Abatacept, CTLA4-Ig) und andererseits anhand der Induktion von autoimmunen Arthritiden bei verstärkter T-Zell-Stimulation unter Immuncheckpoint-Inhibition (z.B. Ipilimumab, anti-CTLA-4-Antikörper) im Rahmen von Tumorummuntherapien ableiten. (Leipe et al. 2017, Leipe, et al. 2018)

Gleichwohl ist das Verständnis der Pathophysiologie autoimmuner Arthritiden einschließlich der Rolle von T-Zellen noch unvollständig. Ziel moderner klinisch-immunologischer/rheumatologischer Forschung ist daher weiterhin das bessere Verständnis der Pathogenese autoimmuner Arthritiden als Grundlage für die Entwicklung von Biomarkern und zielgerichteten Therapiestrategien.

Die rheumatoide Entzündungsreaktion ist zellulär charakterisiert durch ein Überwiegen von proinflammatorischen Effektor-T-Zell-Populationen, während T-Zell-Populationen mit dem Potenzial, die Inflammation abzuschwächen, wie regulatorische T-Zellen (Tregs) oder Th2-Zellen in ihrer Funktion eingeschränkt sind. (Leipe, Skapenko et al. 2005)

Bezüglich proinflammatorischer Effektor-T-Zell-Populationen hat die Entdeckung einer neuen proinflammatorischen CD4-T-Zell-Subpopulation, sogenannter Th17-Zellen, zu einer Erweiterung des Th1/Th2-Schemas geführt und enormes Interesse auf dem Gebiet der (klinischen) Immunologie nach sich gezogen (Harrington et al. 2005). Humane Th17-Zellen, deren Entstehung durch den Transkriptionsfaktor *RAR-related orphan receptor C* (RORC) gesteuert wird, sind in erster Linie durch die Expression des inflammatorischen Zytokins IL-17 (IL-17A) charakterisiert. Th17-Zellen produzieren zum Teil noch weitere Zytokine wie IL-22 und TNF, jedoch weder das Th1-Zytokin IFN- γ noch das Th2-Zytokin IL-4. Die Bedeutung von Th17-Zellen für die Pathogenese verschiedener tierexperimenteller Autoimmunerkrankungen wurde für verschiedene Modelle einschließlich der Kollagen-induzierten Arthritis demonstriert. Beim Menschen, insbesondere bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), gab es bereits einige Befunde, wie z.B. erhöhte Mengen von IL-17 in Synovialflüssigkeit und Serum, die nahelegten, dass Th17-Zellen und das von ihnen produzierte IL-17 von pathophysiologischer Bedeutung sein könnten. IL-17 vermittelt inflammatorische und gewebeschädigende Effekte über den IL-17-Rezeptor, der auf zahlreichen bei der rheumatoiden Gelenkentzündung beteiligten Zellen exprimiert wird, darunter Monozyten, synoviale Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten. (Leipe et al. 2009) IL-17 stimuliert nicht nur die Produktion zahlreicher inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 und TNF aus Monozyten, sondern agiert mit diesen auch noch in synergistischer Weise. Überdies induziert IL-17 die Expression des *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL), einem wichtigen positiven Regulator für Osteoklasten, und führt zur Knorpeldegeneration durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Aggrecanasen, welche vermehrt Typ-II-Kollagen und Proteoglykan abbauen. (Leipe et al. 2017)

Als wesentlicher Teil, der dieser Habilitation zugrunde liegenden Arbeit wurde, die Bedeutung von proinflammatorischen CD4-T-Zell-Populationen – mit Schwerpunkt auf Th17-Zellen und Th17-Zell-assoziierte Zytokine – in der Pathogenese autoimmuner Arthritiden untersucht.

Hierbei konnten wir zunächst anhand mehrerer homogener, klinisch gut definierter Patientenkohorten von RA- und Psoriasis-Arthritis (PsA)-Patienten die zentrale Rolle von Th17-Zellen zum Zeitpunkt der initialen Manifestation, aber

auch im weiteren Verlauf der Erkrankung, nachweisen. (Leipe et al. 2010) Patienten, die sich mit einer mittleren Symptombdauer von weniger als drei Monaten erstmals vorgestellt und noch keinerlei immunmodulierende Therapie erhalten hatten (um den Einfluss chronischer T-Zell-Aktivierung und immunmodulierender Therapien auf die untersuchten CD4-T-Zellen auszuschließen), wiesen signifikant erhöhte Frequenzen von Th17-Zellen mit einer gesteigerten Produktion von IL-17 gegenüber gesunden Kontrollen und Patienten mit Osteoarthritis (Kontrolle für nicht-entzündliche Gelenkerkrankung) auf. In dieser frühen RA-Kohorte, aber auch bei Patienten mit aktiver, etablierter Erkrankung, korrelierten Th17-Zell-Frequenzen und IL-17-Produktion signifikant mit Erkrankungsaktivität und systemischer Entzündung. Zudem konnten wir eine signifikante Anreicherung von Th17-Zellen in den von der Arthritis betroffenen Gelenken beobachten. Als wahrscheinlichen Grund für diese Anreicherung im Gelenk fanden wir auf Th17-Zellen eine erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR6, deren Liganden in entzündeten Gelenken in hoher Konzentration vorkommen. Darüber hinaus konnten wir Mechanismen für das über die Norm vermehrte Auftreten von Th17-Zellen bei Patienten mit autoimmunen Arthritiden identifizieren. So fand sich bei RA- und PsA-Patienten eine verstärkte Differenzierung aus naiven Vorläuferzellen in Richtung Th17-Zellen im Vergleich zu Kontrollen. (Leipe et al. 2010) Passend dazu ließen sich auf molekularer Ebene erhöhte Mengen des für die Entwicklung von Th17-Zellen essenziellen Transkriptionsfaktors RORC bei RA- und PsA-Patienten detektieren. Diese Befunde weisen auf eine gesteigerte Entstehung von Th17-Zellen bei diesen Patienten hin. Interessanterweise fanden sich bei RA- und PsA-Patienten zudem Hinweise für eine Resistenz der Zellen gegenüber natürlichen Antagonisten (IL-4, IFN- γ) der Th17-Zell-Entwicklung und -Aktivität. Dies deutete darauf hin, dass sich die bei Patienten mit autoimmunen Arthritiden vermehrt entstehenden Th17-Zellen wesentlich insuffizienter durch natürliche Antagonisten inhibieren lassen.

In einem weiteren wichtigen Teil, der dieser Habilitation zugrunde liegenden Arbeit wurde, die Th-Zell-Plastizität als möglicher Mechanismus für die beobachtete Dominanz pro-inflammatorischer Th17-Zellen bei autoimmunen Arthritiden untersucht. (Leipe et al. 2019, Leipe et al. 2020) Während die

Entstehung von Th-Zell-Populationen (Th1, Th2, Th17) früher als ein irreversibles Ereignis angesehen wurde, zeigt sich zunehmend, dass es sich um einen plastischen Prozess handelt – d.h., dass Th-Zell-Populationen, z.B. im Kontext einer Entzündung, ihren Phänotyp bzw. das Zytokin-Sekretions-Profil in Richtung eines anderen Phänotyps verändern können.

Um die Plastizität humaner Th-Effektor-Zellen zu untersuchen, wurden zum einen *in vitro* und zum anderen *in vivo* generierte Th-Zellen analysiert. (Leipe et al. 2020) Hierfür wurden nach Differenzierung naiver oder „Memory“-CD4-T-Zellen von RA-Patienten und gesunden Kontrollen viable („lebende“) hochreine Th1-, Th2- und Th17-Zellen mithilfe von Zytokin-Sekretions-Assays sortiert. Diese in unserer Arbeitsgruppe optimierte Methode ermöglichte es, viable Th-Zell-Populationen zu isolieren, zu charakterisieren und deren Plastizität zu untersuchen (im Unterschied zu anderen Publikationen zum Thema „Plastizität“, bei denen Th-Zell-Populationen aufgrund von Oberflächenmolekülen isoliert wurden und somit eine Anreicherung, aber keine höhere Reinheit der Populationen erreicht wird, was unter dem Aspekt eines möglichen Auswachsens von „kontaminierenden“ Populationen im Bereich von Plastizitätsanalysen potenziell problematisch ist). Isolierte Th-Zellen wurden anschließend unter Th0-, Th1-, Th2- und Th17-induzierenden Bedingungen polarisiert (Transdifferenzierung) und somit auf ihre Plastizität untersucht.

Bei *in vitro* generierten Th-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Plastizität von Th1-, Th2- oder Th17-Zellen zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollen. Allerdings ergaben sich neue Erkenntnisse zur Plastizität von Th-Zellen.

Es zeigte sich, dass *in vitro* generierte Th1-Zellen größtenteils ihren Phänotyp (IFN γ +IL-17-) bewahrten und sich lediglich 1-2% in Th17-Zellen (IFN γ -/IL-17+) transdifferenzierten. Eine deutlich höhere Plastizität von Th1-Zellen war in Richtung Th1/Th17-Zellen (IFN γ +IL-17+) mit \approx 30% der Th-1-Zellen zu verzeichnen, die unter Th17-induzierenden Bedingungen in Richtung Th1/Th17-Zellen transdifferenzierten. Unter Th2-induzierenden Bedingungen konnte bei immerhin \approx 15% der *in vitro*-generierten Th1-Zellen die Fähigkeit verzeichnet werden, IL-4 zu produzieren. Diese Ergebnisse bestätigen teilweise frühere Analysen – insbesondere aus murinen Studien, die demonstrierten, dass Th1-

Zellen eher stabil und wenig plastisch sind. Eine ausgeprägte Plastizität fand sich in unseren Analysen humaner Th-Zellen jedoch in Richtung der gemischten Phänotypen Th1/Th17 und Th1/Th2. Dies ist insbesondere unter dem Aspekt interessant, als dass Th1/Th17-Zellen im Vergleich zu Th1-Zellen bei autoimmunen Arthritiden als pathogener gelten, und stellt eine neue Erkenntnis auf dem Gebiet der Plastizität von humanen Th-Zellen dar.

In vitro-generierte Th2-Zellen zeigten einen hohen Grad an Plastizität in Richtung Th1-, vor allem Th1/Th2-Zellen. Allerdings ließen sich nur ca. 1,5% der Th2-Zellen – ähnlich wie bei Th1-Zellen und im Einklang mit Vorarbeiten – in reine Th17-Zellen transdifferenzieren; jedoch im Gegensatz zu Th1-Zellen deutlich weniger zu einem gemischten Phänotyp, hier Th2/Th17-Zellen.

In vitro-generierte Th17-Zellen zeigten eine substanzielle Plastizität zu dem gemischten Phänotyp Th1/Th17-Zellen ($\approx 60\%$), eine geringere Plastizität zu Th1-Zellen (IFN γ +IL-17 $^-$, $\approx 17\%$) und eine sehr geringe Plastizität in Richtung IL-4-produzierende Zellen (IL-4+IL-17 $^-$, $\approx 1,5\%$; IL-4+IL-17 $^+$, $\approx 2,5\%$).

Während Th17-Plastizität anhand *in vitro*-generierter, reiner Th17-Zellen zuvor nur bei Mäusen untersucht wurde und sich heterogene Ergebnisse bezüglich Transdifferenzierung von Th17- in Richtung Th1-Zellen von 2% (41) bis zu 81% ergaben, konnten wir erstmals für humane *in vitro*-generierte Th17-Zellen eine intermediäre Plastizität von 15% in Richtung Th1-Zellen und 58% in Richtung Th1/Th17-Zellen nachweisen.

In einem zweiten wichtigen Set von Experimenten wurde die Plastizität von *in vivo*-generierten humanen Th-Zellen analysiert, die direkt nach Blutentnahme und kurzer Aktivierung sortiert wurden. (Leipe et al. 2020) Ähnlich zu *in vitro*-generierten Th1-Zellen, zeigten *in vivo*-generierte Th1-Zellen eine eher geringe Plastizität. Allerdings fand sich bei RA-Patienten, unabhängig von den Th-induzierenden Bedingungen, eine signifikant verstärkte Plastizität von Th1-Zellen zu Th17- und auch Th1/Th17-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (induzierende Bedingungen: Th17: $p=0,0002$ und $p=0,008$, Th2: $p=0,001$ und $p=0,0003$, Th0: $p=0,09$ und $p=0,04$, jeweils für resultierende Th17- und Th1/Th17-Zellen). Th1-Zellen von RA-Patienten transdifferenzierten zudem auch vermehrt in Richtung Th2/Th17-Zellen unter Th2-induzierenden Bedingungen im Vergleich zu Gesunden ($p=0,04$). Auch *in vivo*-generierte Th2-Zellen von RA-

Patienten zeigten eine verstärkte Transdifferenzierung in Richtung IL-17-exprimierenden Phänotypen (IL-4⁻/IL-17⁺, IL-4⁺/IL-17⁺). Passend zu diesem Shift konnte eine Verringerung von IFN γ ⁺/IL-17⁻ Zellen bei RA-Patienten beobachtet werden (p=0,02).

Somit zeigen *in vivo*-generierte Th1- und Th2-Zellen eine verstärkte Plastizität in Richtung Th17 bzw. IL-17-produzierende Phänotypen.

Interessanterweise zeigten *in vivo*-generierte Th17-Zellen von RA-Patienten hingegen eine Resistenz, ihren Phänotyp in Richtung Th1- oder Th2-Zellen zu verändern. Passend zeigte sich eine geringere Transdifferenzierung nicht nur zu IFN γ ⁺/IL-17⁻, sondern auch zu IL-4⁺/IL-17⁻ Zellen bei RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (p=0,008 und p=0,017).

Somit konnten wir erstmals zeigen, dass während RA Th1- und Th2-Zellen ein intrinsisches Potenzial zu haben scheinen, sich zu Th17-Zellen umzuwandeln, Th17-Zellen von RA-Patienten eine partielle Resistenz im Vergleich zu Gesunden aufweisen, sich in andere (wahrscheinlich weniger pathogene) Th-Subpopulationen umzudifferenzieren.

Um Faktoren zu untersuchen, die der Plastizität von Th-Zellen im Allgemeinen und der veränderten Plastizität von *in vivo*-generierten Th-Zellen von RA-Patienten im Besonderen zugrunde liegen, analysierten wir u.a. Th-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren wie RORC (Th17-Zellen) und T-bet (Th1-Zellen), intrazelluläre Signalwege und epigenetische Modifikationen. (Leipe et al. 2020) Es zeigte sich zunächst, dass sich die Expression von RORC und T-bet bei Th17- und Th1-Zellen von jeweils RA-Patienten und gesunden Kontrollen nicht unterschieden. Dies ist angesichts dessen nachvollziehbar, dass Th17- und Th1-Zellen sowohl von RA-Patienten als auch von gesunden Individuen als hochreine und somit homogene Populationen isoliert wurden. Passend dazu ergab auch die Analyse auf einer anderen Ebene der transkriptionellen Regulation, der sogenannten Histonmodifikationen, keine Unterschiede zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollen. Diese Daten wurden erhoben, um die Frage zu klären, welche Bedeutung epigenetische Veränderungen bei der Plastizität haben. Daher wurden mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) exemplarisch Modifikationen an Histonen nachgewiesen, die entweder für die Aktivierung oder die Unterdrückung von CD4-T-Zell-spezifischen Genen

verantwortlich sind. Während die Trimethylierung von Histon 3 an Position 4 (H3K4me3) und die Acetylierung an Histon 3 (H3ac) mit Aktivierung von Genen assoziiert ist, wird bei Trimethylierung von Histon 3 an Position 27 (H3K27me3) eine Suppression der Genaktivität beobachtet. Th1- und Th17-Zellen von RA-Patienten und gesunden Kontrollen zeigten eine ähnliche Ratio der permissiven Modifikationen H3K4me3 und H3aAc zur repressiven Modifikation H3K27me3 am RORC- und T-bet-Promoter. Wir analysierten darüber hinaus die DNA-Methylierung am RORC- und T-bet-Promoter bei Th1- und Th17-Zellen. Der RORC-Lokus zeigte insgesamt eine offene Chromatinkonfiguration bei Th17-Zellen. Bei RA-Th1- und -Th17-Zellen zeigte sich, obgleich die Methylierung etwas höher an CpG sites 2-5 innerhalb des RORC-Lokus bei RA-Patienten war, doch insgesamt eine ähnliche Methylierung bei RA und Gesunden für RORC und T-bet, passend zur ähnlichen Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren.

Kürzlich wurde zudem eine regulatorische Achse beschrieben, die unabhängig von RORC eine bedeutende Rolle bei der Th17-Zell-Stabilität spielt, die sogenannte SGK1-FOXO1-IL-23R-Achse. (Kleinewietfeld, Manzel et al. 2013) Hierbei führt die Expression von SGK1 zur Produktion des IL-23R durch Deaktivierung von FOXO1, einem direkten Regressor des *IL23r*-Gens. Wir fanden bei *in vivo*-generierten Th-Zellen eine signifikant höhere Expression von SGK1 und IL-23R in frisch isolierten Th1- und Th17-Zellen von RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Passend zur SGK1-FOXO1-IL-23R-Achse zeigten sich tendenziell geringere FOXO-1-Mengen bei RA-Patienten. (Leipe et al. 2020) Die höhere Expression von SGK1 bei RA-Th1- und -Th17-Zellen könnte intrinsisch sein und somit zu einer höheren Plastizität in Richtung Th17-Zellen bzw. einer höheren Stabilität von Th17-Zellen beitragen. Alternativ könnte ein höherer Salzkonsum, wie bei aktiver RA beschrieben, SGK1 im besonderen Maße induzieren. Aufgrund der Tatsache, dass wir in frisch isolierten *in vivo*-generierten T-Zellen von RA-Patienten Unterschiede im SGK1/IL-23R-Signalweg, jedoch nicht bezüglich der Transkriptionsfaktoren zu diesem Zeitpunkt fanden, analysierten wir RORC und T-bet und Moleküle des SGK1/IL-23R-Signalwegs nach Transdifferenzierung von Th1- und Th17-Zellen, um die Hypothese zu testen, dass sich Unterschiede, insbesondere in der Expression der Transkriptionsfaktoren, während der Transdifferenzierung ergeben. Hierbei

zeigte sich, dass Th1-Zellen von RA-Patienten, die unter Th17-induzierenden Bedingungen transdifferenziert wurden, höhere Mengen an RORC exprimierten als gesunde Kontrollen ($p < 0,01$), während T-bet vergleichbar war. Zudem zeigten Th17-Zellen unter Th1-induzierenden Bedingungen eine höhere RORC- und geringere T-bet-Expression bei RA-Patienten – passend zur reduzierten Kapazität dieser Zellen, sich in Th1-Zellen zu transdifferenzieren. Weiterhin zeigte sich auch eine höhere Expression von SGK1 und IL-23R bei Th1- und Th17-Zellen nach Transdifferenzierung bei RA-Patienten, während dazu passend FOXO1 erniedrigt war.

Zusammengefasst scheinen Unterschiede im SGK1/IL-23R-Signalweg sowie eine erhöhte Expression von RORC während der Transdifferenzierung zu dem Th17-Phänotyp im Rahmen der Plastizität von RA-Th-Zellen beizutragen.

Wir konnten demzufolge, neben neuen Erkenntnissen zur Th-Zell-Plastizität, erstmals eine veränderte Th-Zell-Plastizität in Richtung Th17 bei Patienten mit autoimmunen Arthritiden demonstrieren, die potenziell zum beobachteten systemischen und intraartikulären Th17-Shift beiträgt.

Um die sich aus diesen Erkenntnissen zur veränderten Th-Plastizität ergebende Hypothese zu testen, dass bestimmte Th1-Subpopulationen zu der beobachteten Plastizität in Richtung Th17-Zellen beitragen, wurden sogenannte „klassische“ und „nicht-klassische“ Th1-Zellen bei Patienten mit autoimmunen Arthritiden und gesunden Individuen analysiert. (Leipe et al. 2019) Die Existenz dieser zwei Untergruppen innerhalb der Th1-Population, „klassische“ (IFN γ +/IL-17–, Tbet+, RORC–, CD161–, CCR6–) und „nicht-klassische“ (IFN γ +/IL-17–, Tbet–, RORC+, CD161+, CCR6+) Th1-Zellen, wurde erst kürzlich beschrieben. Es wurde postuliert, dass „nicht-klassische“ Th1-Zellen (exprimieren den Th17-Zell-Transkriptionsfaktor RORC) im Rahmen von plastischen Veränderungen aus Th17-Zellen heraus entstehen. Daten, die ein vermehrtes Auftreten „nicht-klassischer“ im Verhältnis zu „klassischen“ Th1-Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen zeigten, wie im von M. Crohn befallenen Darm und im Gelenk juveniler idiopathischer Arthritis, führten zur Vermutung eines höheren pathogenen Potenzials. (Annunziato, Cosmi et al. 2014). Wir konnten erstmals zeigen, dass die Transdifferenzierung von „nicht-klassischen“ Th1-Zellen unter Th17-induzierenden Bedingungen zu deutlich erhöhten Frequenzen von Th17-

und Th1/Th17-Zellen führt, während keine substanzielle Plastizität in Richtung Th17-Zellen für „klassische“ Th1-Zellen beobachtet wurde (Th17-Zellen: 3,9% vs. 0,9%, $p=0,045$; Th17/Th1-Zellen: 16,6% vs. 0,9%, $p=0,00003$). Interessanterweise zeigten „klassische“ Th1-Zellen eine verstärkte Plastizität in Richtung IL-4-produzierender Zellen, die meisten davon Th1/Th2-Zellen (IFN γ +/IL-4+), im Vergleich zu „nicht-klassischen“ Th1-Zellen (Th1/Th2-Zellen: 8,4% vs. 3,0%, $p=0,015$). Passend dazu fand sich *ex vivo* eine höhere RORC-Expression in „nicht-klassischen“ Th1-Zellen und eine höhere GATA-3-Expression in „klassischen“ Th1-Zellen. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Frequenzen „klassischer“ und „nicht-klassischer“ Th1-Zellen zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass „nicht-klassische“ Th1-Zellen eine substanzielle Plastizität in Richtung Th17-Zellen aufweisen, die möglicherweise zu deren pathogenem Potenzial beiträgt. Hingegen zeigen „klassische“ Th1-Zellen die Eigenschaft, einen IL-4-produzierenden Phänotyp anzunehmen und könnten somit bei Autoimmunerkrankungen eine geringere Pathogenität aufweisen. Ähnliche Frequenzen „klassischer“ und „nicht-klassischer“ Th1-Zellen zwischen RA-Patienten und gesunden Kontrollen *ex vivo* könnten auf einen konservierten Phänotyp dieser Populationen nach deren *in vivo*-Entstehung und gegen eine Beteiligung von „nicht-klassischen“ Th1-Zellen zu dem bei RA-Patienten beobachteten Th17-Phänotyp hinweisen.

Die rheumatoide Entzündungsreaktion ist nicht nur zellulär charakterisiert durch ein Überwiegen von pro-inflammatorischen Effektor-T-Zell-Populationen, sondern auch durch eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen

In diesem Sinne produzieren Th17-Zellen neben ihrem Signatur-Zytokin IL-17 ein weiteres für die Pathogenese autoimmuner Arthritiden potenziell bedeutsames Zytokin: IL-22. (Leipe et al. 2009) Ähnlich wie bei IL-17 kommt es bei Neutralisation von IL-22 oder bei IL-22-Knockout-Mäusen zu einem milderem Verlauf der Arthritis.

In einer weiteren Arbeit wurden die Expression von IL-22 und deren Bedeutung in der Pathogenese der RA untersucht. (Leipe et al. 2011) Die gemessenen IL-22-Serumkonzentrationen waren tendenziell bei RA-Patienten höher als bei den Kontrollindividuen (Gesunde und Patienten mit Osteoarthritis).

Interessanterweise ließen sich innerhalb der RA-Kohorte anhand der IL-22-Serumspiegel zwei verschiedene Gruppen identifizieren. Eine Gruppe (n=25) war durch IL-22-Serumspiegel charakterisiert, die innerhalb von drei Standardabweichungen der Kontrollwerte lagen („IL-22 normal“), während die andere Gruppe (n=24) deutlich erhöhte IL-22-Serumspiegel aufwies („IL-22 high“). Der Vergleich beider Gruppen ergab keinen Unterschied in Bezug auf demografische Faktoren, Antikörperstatus (Rheumafaktor, anti-CCP-Antikörper) oder Krankheitsaktivität. Hierbei zeigte sich, dass Patienten, bei denen zu Baseline hohe IL-22-Werte gemessen wurden, bereits zu diesem früheren Zeitpunkt häufiger manifeste Gelenkerosionen aufwiesen als Patienten der „IL-22 normal“-Gruppe (33% vs. 4%, $p=0,05$). Während im zweijährigen Verlauf bei keinem einzigen Patienten der „IL-22 normal“-Gruppe weitere Erosionen detektiert wurden, entwickelten fünf weitere Patienten der Gruppe „IL-22 high“ im ersten Jahr Erosionen (57% vs. 4%, $p<0,01$) und im Laufe des zweiten Jahres ein weiterer Patient (61% vs. 4%, $p<0,005$). Diese Assoziation zwischen erhöhten IL-22-Werten zu Beginn der Erkrankung und der Entstehung von Gelenkerosionen im weiteren Krankheitsverlauf war auch nach Korrektur für Alter, Geschlecht, Raucheranamnese, Krankheitsaktivität, Rheumafaktor und anti-CCP-Antikörper-Positivität in der multivariaten Regressionsanalyse hochsignifikant.

Somit stellen IL-22-Werte einen unabhängigen Prädiktor für die Entstehung von Gelenkerosionen bei der RA dar. Die Messung der IL-22-Serumkonzentration erlaubt daher zu Beginn der Erkrankung die Diskrimination von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen bzw. radiografischer Progression und kann daher als Biomarker verwendet werden. Dies führte auch zur Patentanmeldung (EP 11 001 695.3).

Als zelluläre Quelle der erhöhten IL-22-Spiegel konnten wir erhöhte Frequenzen von IL-22-produzierenden CD4-Subpopulationen bei RA-Patienten identifizieren. Hierbei konnten wir erstmals zeigen, dass sowohl IL-22-produzierende Th17-Zellen (IL-22+IL-17+IFN γ -) als auch Th22-Zellen (IL-22+IL-17-IFN γ -), Th1-Zellen (IL-22+IL-17-IFN γ +) und Zellen, die sämtliche Zytokine produzieren (IL-22+IL-17+IFN γ +), vermehrt in der Zirkulation von RA-Patienten zu finden waren. Zusammenfassend zeigte sich auf zellulärer Ebene, passend zu den

Serumspiegeln, eine erhöhte Expression von IL-22 durch CD4-T-Zellen von RA-Patienten.

In einer weiteren Arbeit zeigte sich, dass erhöhte IL-22-Serumspiegel auch bei Patienten mit bereits etablierter Erkrankung mit der radiologischen Progression assoziiert sind. Erhöhte IL-22-Serumspiegel scheinen RA-spezifisch zu sein, da in diesem Maße erhöhte Spiegel bei anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen nicht beobachtet werden und Komorbiditäten (Hypertonus etc.) zu keinen höheren Spiegeln zu führen scheinen.

Wie bereits erwähnt, ist die rheumatoide Entzündungsreaktion, neben dem Überwiegen von proinflammatorischer Effektor-T-Zell-Populationen, auch durch in ihrer Funktion eingeschränkte Zellpopulationen bzw. Zytokine, welche die Inflammation abschwächen, wie Th2-Zellen bzw. IL-4, charakterisiert.

In diesem Sinne konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die IL-4-Signalübertragung bei RA-Patienten gestört ist und es in der Folge zu verstärkter Inflammation und ungünstigerem Verlauf der Erkrankung kommt. Zudem war ein *loss of function Single Nucleotide Polymorphism (SNP, rs1805010)* innerhalb der kodierenden Region des IL-4 Rezeptors (*IL4R*) mit einem deutlich aggressiveren Verlauf der RA und frühzeitiger Gelenkzerstörung assoziiert. Der besagte *IL4R*-SNP, bei dem das Wildtyp (WT)-Allel Isoleucin (I) gegen Valin (V) an Aminosäureposition 50 ausgetauscht ist, führt zu einer deutlichen Reduktion der IL-4-Signalübertragung sowie von *downstream*-Effekten.

Die Beobachtung, dass bei RA-Patienten einerseits die Signalübertragung von IL-4 genetisch bedingt eingeschränkt ist und andererseits Th17-Zellen, deren Entstehung durch IL-4 inhibiert wird, vermehrt zu finden sind, führte zu der Hypothese, dass oben genannter *IL4R*-SNP, insbesondere bei RA-Patienten, durch die eingeschränkte Wirkung von IL-4 und den konsekutiven Wegfall der negativen Regulation zu der verstärkten Entstehung von Th17-Zellen und erhöhter Gelenkdestruktion beiträgt.

Nach Genotypisierung von Patienten mit früher RA (n=90) sowie bei Kontrollen, gesunden Individuen (n=24) und Patienten mit Osteoarthritis (n=15), zeigte sich zunächst, dass Th17-Zell-Frequenzen, IL-17- und IL-22-Serumspiegel bei RA-Patienten mit Homozygotie für das mutierte V50-Allel (V50V) im Vergleich zu gesunden oder OA-Kontrollen erhöht waren. (Leipe et al. 2014) Die zuvor

beobachteten erhöhten Th17-Zell-Frequenzen und Effektorfunktionen waren also mit dem hypofunktionellen V50-*IL4R*-Allel assoziiert. Tatsächlich sprachen T-Zellen von homozygoten V50V-Individuen in einem *in vitro*-Assay nach Zugabe von IL-4 schwächer auf die IL-4-medierte Inhibition der Th17-Zell-Entwicklung im Vergleich zu den I50I- oder I50V-Individuen an. Nach Analyse der klinischen Daten dieser Patienten im Follow-up zeigte sich, dass die RA-Patienten mit dem V50V-Genotyp nach einem Jahr eine signifikant höhere Erkrankungsaktivität (gemessen am DAS28 [*disease activity score in 28 joints*]) und ein niedrigeres Ansprechen auf die Therapie zeigten (gemessen am EULAR [European League Against Rheumatism]-Ansprechen und an Remissionskriterien). Die RA-Patienten wurden zudem auf das Vorhandensein bzw. die Entwicklung von Gelenkerosionen zum Zeitpunkt der Rekrutierung und nach einem Jahr geprüft. Die Entstehung von Erosionen zu Beginn der Erkrankung ist mit einer aggressiveren Erkrankung und ungünstigerer Prognose der RA assoziiert. RA-Patienten mit dem V50V-Genotyp manifestierten bereits zu Baseline, also nach nur durchschnittlich 2,9 Monaten Krankheitsdauer, häufiger Erosionen als die Patienten der I50/I50- und I50/V50-Gruppe (29% vs. 19% und 21%). Während der Follow-up-Periode entwickelten weitere Patienten der I50V- und V50V-Gruppe Erosionen, während bei keinem Patienten der I50I-Gruppe dies zu beobachten war. Die statistische Analyse ergab eine signifikante Assoziation zwischen der Entstehung von Erosionen und dem Verlust von funktionellen *IL4R*-Allelen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der V50V-Genotyp des *IL4R*-SNP bei RA-Patienten durch die eingeschränkte Wirkung von IL-4 und den konsekutiven Wegfall der negativen Regulation zu der verstärkten Entstehung von Th17-Zellen mit erhöhter Krankheitsaktivität und verstärkter Gelenkdestruktion potenziell beiträgt.

Wie zuvor bereits beschrieben, sind Th2-Zellen bzw. das von ihnen produzierte IL-4 im Kontext von Autoimmunerkrankungen jeweils anti-inflammatorische Th-Zellen bzw. Zytokin, welche die Differenzierung von pro-inflammatorischen Th1- und Th17-Zellen inhibieren und somit eine überschießende Immunantwort mit konsekutiv ungezügelter Inflammation verhindern. Wir konnten erstmals im Menschen zeigen, dass Th2-Zell-Differenzierung durch den Transkriptionsfaktor

GATA-3 reguliert wird. (Leipe et al. 2004) Hierbei hatten wir die seltene Gelegenheit, die immunologische Funktion von humanem GATA-3 *in vivo* zu untersuchen: durch Analyse peripheren Blutes von Individuen, die nur ein funktionelles GATA-3-Allel besitzen (GATA-3^{+/-}-Individuen). Diese haploinsuffizienten Individuen wiesen verschiedene chromosomale Aberrationen, den GATA-3-Lokus betreffend, auf. Individuum 1 zeigte eine 49-bp-intragenische Deletion, die zu einem Frameshift mit prematurem Stop-Codon führte; Individuum 2 eine 900-kb-Deletion, die zur Deletion eines Allels führte, und Individuum 3 eine terminale Deletion des Chromosoms 10p, die zur Deletion eines Allels führte. Alle Patienten waren vom sogenannten HDR-Syndrom (*hypoparathyroidism, sensorineural deafness, renal disease*) betroffen, einer genetischen Erkrankung, bei der die Patienten wegen der Bedeutung von GATA-3 während der embryonalen Organentwicklung an Hypoparathyreoidismus, Innenohrschwerhörigkeit und Niereninsuffizienz leiden.

CD4-T-Zellen der GATA-3^{+/-}-Individuen exprimierten signifikant reduzierte Mengen an GATA-3, was mit dramatisch erniedrigten Frequenzen an Th2-Zellen *in vivo* assoziiert ist. Auch *in vitro* konnte nach Differenzierung der GATA-3^{+/-}-CD4-T-Zellen eine Verminderung der Th2-Zell-Differenzierung festgestellt werden. Die durch Th2-Zellen vermittelten Effektorfunktionen *in vivo*, welche anhand von Serumspiegeln der Th2-abhängigen Immunglobuline IgG4 und IgE bestimmt wurden, waren erheblich vermindert, während die Konzentration des Th1-abhängigen Immunglobulins IgG1 im Vergleich zu gesunden GATA-3^{+/-}-Individuen erhöht war. In Übereinstimmung mit den bereits dargestellten Ergebnissen führte *Silencing* von GATA-3, mittels spezifischer *small interfering RNA* (siRNA), zu einer signifikant reduzierten Th2-Zell-Differenzierung *in vitro* – als Beweis dafür, dass GATA-3 die Th2-Zell-Differenzierung von humanen CD4-T-Zellen reguliert. Wir konnten zudem nachweisen, dass die Expression von GATA-3 während der Differenzierung zu Th2-Zellen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene ansteigt.

Zusammenfassend konnten wir demonstrieren, dass GATA-3 einen wichtigen Transkriptionsfaktor in der Regulation der humanen Th2-Zell-Differenzierung darstellt.

Schließlich lässt sich, wie bereits erwähnt, die zentrale Rolle von T-Zellen anhand der Induktion von autoimmunen Arthritiden bei verstärkter T-Zell-Stimulation unter Immuncheckpoint-Inhibition im Rahmen von Tumor-Immuntherapien ableiten. (Leipe et al. 2017, Leipe et al. 2019). In einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten prospektiven Kohortenstudie konnten wir zunächst zeigen, dass die Prävalenz von autoimmunen Arthritiden bei Patienten mit Arthralgien unter Immuncheckpoint-Inhibitor (ICI)-Therapie hoch ist. (Leipe et al. 2018) Im Gegensatz zu Arthritiden ohne Assoziation zu Tumor-Immuntherapien war der Anteil von Männern mit ICI-induzierten Arthritiden (57%) und der Anteil von seronegativen Patienten (69%) verhältnismäßig hoch. Es zeigte sich ein Arthritis-Muster mit Monoarthritis (50%), Oligoarthritis (36%) und Polyarthritis (14%). Synoviaanalysen waren konsistent mit hochentzündlichen Arthritiden (≥ 2.000 Leukozyten/mm³). Das Zeitintervall vom Beginn der ICI-Therapie bis zum Auftreten der Arthritiden war variabel (1 bis 716 Tage, Median: 139 Tage), die Zeit von der Konsultation bis zur rheumatologischen Erstvorstellung betrug nur $9,5 \pm 9,3$ Tage, die Zeit vom Beginn der Gelenkschmerzen bis zur Bestätigung der Arthritiden betrug $2,5 \pm 4,4$ Monate, was auf eine zügige Diagnosestellung, jedoch auch auf eine relativ lange Latenz bis zur rheumatologischen Vorstellung hinweist. Bezüglich der Diagnostik konnten wir anhand verblindeter radiologischer Auswertungen von 41 Gelenkregionen demonstrieren, dass sich in den zum Zwecke des Tumor-Stagings durchgeführten Computertomographien bereits in 15 % und in Positronen-Emissions-Tomographie-CTs in 24 % der Fälle Hinweise auf Arthritiden zeigten, was auf den potenziellen Nutzen dieser bildgebenden Verfahren zur Objektivierung von Synovitiden hindeutet. Die Krankheitslast zu Beginn (gemessen anhand der numerischen Rating-Skala von 1 bis 10) war mit $7,3 \pm 1,0$ hoch und konnte durch antientzündliche Therapien signifikant auf $2,0 \pm 1,3$ ($p < 0,0001$) reduziert werden. Alle Patienten erhielten Glukokortikoide systemisch und/oder intraartikulär, mit gutem Ansprechen. Unter Glukokortikoid-Tapering kam es bei 46% der Patienten zu einer Zunahme der Arthritis-Aktivität, woraufhin erfolgreich Methotrexat eingesetzt wurde. Während des medianen Follow-up von 433 Tagen wurde keine Toxizität der anti-inflammatorischen Therapie oder Tumorprogress beobachtet.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass ICI-induzierte Arthritiden im Vergleich zu traditionellen rheumatologischen Entitäten andere Charakteristika aufweisen, sich jedoch anhand einer Stufentherapie mit Glukokortikoiden und ggf. Methotrexat gut beherrschen lassen. Basierend auf diesen und anderen Daten konnten wir Empfehlungen zum Management rheumatologischer Nebenwirkungen der Immuncheckpoint-Inhibition erarbeiten.

Zusammenfassend haben die Arbeiten, welche dieser Schrift zugrunde liegen, neue Erkenntnisse zur Rolle von T-Zellen, insbesondere deren Bedeutung in der Pathogenese autoimmuner Arthritiden, ergeben. Wir konnten erstmals – als Hinweis für die pathophysiologische Bedeutung – eine Korrelation von Th17-Zellen mit Arthritis-Aktivität und systemischer Entzündung sowie deren Anreicherung in betroffenen Gelenken therapienaiver Patienten demonstrieren. Im Rahmen der weiteren Charakterisierung von Th17-Zellen zeigte sich, dass das von Th17-Zellen, aber auch von Th22-Zellen produzierte Zytokin IL-22 mit Erosionen, also beginnender Gelenkdestruktion, bei Arthritiden assoziiert war und als möglicher Biomarker fungieren kann.

Als Mechanismen für das über die Norm vermehrte Auftreten von Th17-Zellen bei Arthritiden identifizierten wir deren gesteigerte Differenzierung aus naiven Vorläuferzellen in Richtung Th17-Zellen (mit spezifisch erhöhter Expression des Transkriptionsfaktors RORC einhergehend) und deren Resistenz gegenüber natürlichen Antagonisten (IL-4, IFN- γ). Die klinische Bedeutung der IL-4-vermittelten negativen Th17-Zell-Regulation konnten wir bei Individuen/Patienten, welche ein reduziertes IL-4R-*Signaling* aufwiesen, anhand vermehrter Th17-Zell-Entstehung mit erhöhter Krankheitsaktivität und verstärkter Gelenkdestruktion untermauern. Als weiteren Mechanismus für den beobachteten Th17-Shift bei Arthritiden konnte eine veränderte Th-Zell-Plastizität von Th1- und Th2-Zellen in Richtung Th17 nachgewiesen werden. Schließlich konnten wir demonstrieren, dass sich unter den Th1-Zellen vor allem sogenannte „nicht-klassische“ Th1-Zellen im Rahmen von plastischen Veränderungen zu Th17-Zellen umdifferenzieren.

2. Referenzen

Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi and S. Romagnani (2014). "Human Th1 dichotomy: origin, phenotype and biologic activities." Immunology. Oct **5**. doi: 10.1111/imm.12399

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123–1132.

Kleinewietfeld, M., A. Manzel, J. Titze, H. Kvakan, N. Yosef, R. A. Linker, D. N. Muller and D. A. Hafler (2013). "Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells." Nature **496**(7446): 518–522.

2.1. Habilitationsrelevante Referenzen/ Publikationen

J. Leipe, M. Grunke, C. Dechant, C. Reindl, U. Kerzendorf, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2010). "Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis." Arthritis Rheum **62**(10): 2876–2885.

J. Leipe, F. Pirronello, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2020). "Altered T cell plasticity favours Th17 cells in early arthritis." Rheumatology (Oxford). Feb 6. pii: kez660.

J. Leipe, F. Pirronello, A. Klose, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2019). "Increased plasticity of non-classic Th1 cells toward the Th17 phenotype." Mod Rheumatol: Oct 17: 1–7.

J. Leipe, M. A. Schramm, M. Grunke, M. Baeuerle, C. Dechant, A. P. Nigg, M. N. Witt, V. Vielhauer, C. S. Reindl, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2011). "Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **70**(8): 1453–1457.

J. Leipe, M. A. Schramm, I. Prots, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2014). "Increased Th17 cell frequency and poor clinical outcome in rheumatoid arthritis are associated with a genetic variant in the IL-4R gene, rs1805010." Arthritis Rheum. May; **66**(5): 1165–75.

A. Skapenko*, **J. Leipe***, U. Niesner, K. Devriendt, R. Beetz, A. Radbruch, J. R. Kalden, P. E. Lipsky and H. Schulze-Koops (2004). "GATA-3 in Human T Cell Helper Type 2 Development." J Exp Med **199**(3): 423–428.

J. Leipe and X. Mariette (2019). "Management of rheumatic complications of ICI therapy: a rheumatology viewpoint." Rheumatology (Oxford) **58**(Supplement_7): vii49–vii58.

J. Leipe, L. A. Christ, A. P. Arnoldi, E. Mille, F. Berger, M. Heppt, I. Goldscheider, D. Kauffmann-Guerrero, R. M. Huber, C. Dechant, C. Berking, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2018). "Characteristics and treatment of new-onset arthritis after checkpoint inhibitor therapy." RMD Open **4**(2): e000714.

Patentschrift WO 2012/116809 A1

J. Leipe, A. Skapenko, H. Schulze-Koops.: IL-22 as a prognostic and diagnostic marker in rheumatoid arthritis. Internationales Patent, internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/00876, internationale Veröffentlichungsnummer: WO 2012/116809 A1. Anmeldetag: 29.02.2012 mit Priorität 01.03.2011, veröffentlicht: 07.09.2012, Patentklassen (IPC): G01N 33/564, G01N 33/68

2.2. Weitere eigene relevante Referenzen/ Publikationen

J. Leipe, A. Skapenko, P. E. Lipsky and H. Schulze-Koops (2005). "Regulatory T cells in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **7**(3): 93.

J. Leipe, A. Skapenko and H. Schulze-Koops (2009). "[Th17 cells – a new proinflammatory T cell population and its role in rheumatologic autoimmune diseases]." Z Rheumatol **68**(5): 405–408.

J. Leipe (2015). "[Interleukin-22 – friend or foe?]." Z Rheumatol **74**(1): 51–53.

J. Leipe and H. D. Chang (2015). "[Effector T cells]." Z Rheumatol **74**(1): 14–19.

J. Leipe and H. Schulze-Koops (2017). Pathogenetic concepts of joint diseases. Principles of bone and joint research. P. P. Cham, Springer: 173–187.

Thummler, K., **J. Leipe**, A. Ramming, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2010). "Immune regulation by peripheral suppressor T cells induced upon homotypic T cell/T cell interactions." J Leukoc Biol **88**(5): 1041–1050.

Ramming, A., D. Druzd, **J. Leipe**, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2012). "Maturation-related histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development." Blood **119**(20): 4665–4674.

Haupt, S., V. S. Sontgerath, **J. Leipe**, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2016). "Methylation of an intragenic alternative promoter regulates transcription of GARP." Biochim Biophys Acta **1859**(2): 223–234.

Hueber, A. J., D. L. Asquith, A. M. Miller, J. Reilly, S. Kerr, **J. Leipe**, A. J. Melendez and I. B. McInnes (2010). "Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium." J Immunol **184**(7): 3336–3340.

Kostine, M., A. Finckh, C. O. Bingham, 3rd, K. Visser, **J. Leipe**, H. Schulze-Koops, E. H. Choy, K. Benesova, T. Radstake, A. P. Cope, O. Lambotte, J. E. Gottenberg, Y. Allenbach, M. Visser, C. Rusthoven, L. Thomasen, S. Jamal, A. Marabelle, J. Larkin, J. Haanen, L. H. Calabrese, X. Mariette and T. Schaeffer (2020). "EULAR points to consider for the diagnosis and management of rheumatic immune-related adverse events due to cancer immunotherapy with checkpoint inhibitors." Ann Rheum Dis. Apr **23**. pii: annrheumdis-2020-217139

Zhou, Q., S. Haupt, J. T. Kreuzer, A. Hammitzsch, F. Proft, C. Neumann, **J. Leipe**, M. Witt, H. Schulze-Koops and A. Skapenko (2014). "Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis. Jun; **74**(6): 1265–74.

3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Alla Skapenko für die kontinuierliche Führung und Begleitung meiner wissenschaftlichen Arbeiten seit Anbeginn, ohne die diese Habilitation nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Hendrik Schulze-Koops möchte ich als langjährigem Chef und Mentor für die wohlwollende und unermüdliche Unterstützung meines wissenschaftlichen Werdegangs danken, ebenso für die Möglichkeit, die dieser Habilitation zugrunde liegenden Arbeiten in seiner Rheumaeinheit durchführen zu können.

Beide haben mir vorgelebt, wie (Grundlagen-)Wissenschaft mit all ihren aufregenden Facetten gelebt werden kann und mich bei der Etablierung als Wissenschaftler in außerordentlichem Maße unterstützt.

Danken für ihre Unterstützung möchte ich auch den weiteren Mitgliedern des Fachmentorats, Herrn Prof. Dr. Zwißler und Herrn Prof. Dr. Brand.

Mein weiterer großer Dank gilt den Doktoranden und Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Forschungslabors der Rheumaeinheit für ihre beständige Unterstützung.

Ich möchte mich zudem bei den Kollegen der Rheumaeinheit-Ambulanz bedanken, die mir bei der Rekrutierung von Patienten und der Bereitstellung klinischer Daten geholfen haben.

Weiterhin gilt mein Dank den Patienten und Probanden für ihre Bereitschaft, die wissenschaftlichen Studien zu unterstützen.

Danken möchte ich meinen lieben Eltern und Großeltern, deren Unterstützung die Voraussetzungen für meinen Werdegang geschaffen hat.

Schließlich danke ich meiner Frau Genia Leipe von ganzem Herzen für ihre verständnisvolle und liebevolle Unterstützung in all den arbeitsreichen Jahren, die oft von notwendigen Abwesenheiten geprägt waren. Ohne ihre Hilfe wäre die Fertigstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.