

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Frühkindliche chronisch-entzündliche Darmerkrankungen –
Von der Aufklärung molekularer Krankheitsmechanismen
zur Entwicklung personalisierter Therapien**



Kumulative Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi
im Fach Experimentelle Pädiatrie

vorgelegt von
Dr. med. Daniel Kotlarz, PhD

2022

Fachmentorat

Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Prof. Dr. med Stefan Endres

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung.....	1
1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen – Eine globale Krankheitslast.....	1
1.2 Die Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	2
1.3 Frühkindliche Verlaufsformen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	4
1.4 Diagnostik der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	5
1.5 Die Therapie von pädiatrischen Verlaufsformen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	6
2 Zielsetzung des Habilitationsprojekts.....	8
3 Teilprojekte und Bedeutung der Forschungsarbeiten für das Fachgebiet.....	10
3.1 Identifizierung von Patienten mit monogenetischen IL-10R-Defizienzen – Ein Paradigmenwechsel in der translationalen Erforschung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	10
3.2 Hämatopoetische Stammzelltransplantationen als kurative Behandlung für CED-Patienten mit IL-10- und IL-10R-Defizienzen.....	12
3.3 Die Identifizierung der biallelischen TGFB1-Defizienz als neue molekulare Ursache für frühkindliche CED betont die essentielle Funktion von TGF- β 1 in der Regulierung der intestinalen Homöostase.....	14
3.4 Monogenetische CASP8-Defizienzen unterstreichen die essentielle Funktion von CASP8 als Regulator der humanen intestinalen Homöostase.....	16
3.5 Monogenetische RIPK1-Defizienzen demonstrieren die essentielle Rolle von RIPK1 in der Regulierung der humanen Immunität und intestinalen Inflammation....	18
3.6 Aufklärung grundlegender RNA-Splicingmechanismen des Interleukin-2-Rezeptors durch Charakterisierung einer seltenen und komplexen monogenetischen Form der IL2RG-Defizienz.....	20
3.7 CARMIL2-Defizienz als monogenetische Ursache für frühkindliche chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.....	22
3.8 NOX1-abhängige Regulation der Zellmigration von intestinalen Epithelzellen im Rahmen der Wundheilung – Einblicke von Patienten mit einer Loss-of-Function-Mutation im NOX1-Gen.....	24
3.9 Humanisierte Mausmodelle als innovative präklinische Krankheitsmodelle für CED – Evaluation einer niedrigdosierten Interleukin-2-Therapie für Patienten mit Colitis ulcerosa.....	26

4	Status Quo und Ausblick.....	28
5	Literaturverzeichnis.....	31
6	Abkürzungsverzeichnis.....	42
7	Vollständiges Schriftenverzeichnis.....	44
	7.1 Originalarbeiten als Erst- und Letztautor.....	44
	7.2 Originalarbeiten als Koautor.....	46
	7.3 Übersichtsartikel/Reviews.....	50
8	Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsschrift.....	51
9	Danksagung.....	53

1 Einführung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen – Eine globale Krankheitslast

Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) handelt es sich um chronische und/oder schubweise rezidivierende Entzündungen des Gastrointestinaltrakts (Podolsky, *N Engl J Med* 2002). CED haben aus medizinischer und gesundheitsökonomischer Versorgungsperspektive eine hohe Relevanz, da schätzungsweise 6,8 Millionen Menschen weltweit im Jahr 2017 an CED litten (Collaborators, *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020).

Vor dem Hintergrund klinischer Charakteristika und der Ausdehnung bzw. Schwere der Entzündung werden Morbus Crohn und Colitis ulcerosa als zwei Hauptmanifestationsformen der CED unterschieden (Podolsky, *N Engl J Med* 2002). Patienten mit Morbus Crohn zeigen eine transmurale Entzündung mit segmentaler Ausbreitung im gesamten Gastrointestinaltrakt. Im Gegensatz dazu weisen Patienten mit Colitis ulcerosa oberflächliche Entzündungen der Darmschleimhaut im Kolon auf, wobei sich die Entzündung in der Regel vom Enddarm ausgehend nach proximal ausbreitet. Im Erwachsenenalter können jedoch ca. 5 – 10 % der Krankheitsverläufe weder als Morbus Crohn noch Colitis ulcerosa eindeutig klassifiziert werden, so dass man in diesen Fällen von einer Colitis indeterminata (engl., *inflammatory bowel disease unclassified*, IBD-U) spricht.

Die klinische Präsentation der CED kann in Abhängigkeit von der Lokalisation der befallenen Darmregionen und der Entzündungsaktivität variieren. Als Leitsymptome einer CED können wiederkehrende Durchfälle, abdominelle Schmerzen, Übelkeit, Mangelernährung, Gewichtsverlust, Anämie, Fieber und Abgeschlagenheit auftreten. Während Patienten mit Morbus Crohn ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von Fisteln und Abszessen aufzeigen, zählen Blutungen, das toxische Megakolon, Darmperforationen, und ein erhöhtes Darmkrebsrisiko zu den typischen Komplikationen der Colitis ulcerosa. Darüber hinaus können extraintestinale Manifestationen mit einer Frequenz von 6 – 47 % bei Patienten mit CED auftreten, wobei alle Organsysteme befallen sein können. Insbesondere werden Beteiligungen der Gelenke (Arthropathien), der Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Sweet-Syndrom, aphthöse Stomatitis), des hepatobiliären Systems (primäre sklerosierende Cholangitis) und der Augen (Episcleritis, Uveitis) beobachtet (Vavricka et al., *Inflamm Bowel Dis* 2015).

Zusammenfassend führen chronische Verläufe der CED zu enormen körperlichen Funktionsstörungen und psychosozialen Belastungssituationen.

1.2 Die Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

CED sind multifaktorielle Erkrankungen und die Ätiologie ist bisher nur unzureichend aufgeklärt. Die Entstehung von CED wird durch ein komplexes Zusammenspiel mit einer Vielzahl von Umweltfaktoren (z. B. Ernährung, Hygiene, Rauchen, Stillen oder Antibiotikaexposition), Veränderungen der Darmflora, Störungen der epithelialen Schleimhautbarriere und Dysfunktionen des Immunsystems in genetisch prädisponierten Patienten begünstigt (Xavier and Podolsky, *Nature* 2007). Im Zentrum der Pathogenese wird eine überschießende Immunantwort gegenüber der bakteriellen Darmflora angenommen. Vor dem Hintergrund der multifaktoriellen Krankheitsmechanismen kann bei CED-Patienten eine große interindividuelle Heterogenität in der Pathogenese beobachtet werden.

Genetische Prädisposition bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Bedeutung der genetischen Veranlagung bei CED konnte insbesondere durch (i) die erhöhte Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen (Brant, *Inflamm Bowel Dis* 2011), (ii) eine höhere familiäre Belastung bei Verwandten ersten Grades (Orholm et al., *N Engl J Med* 1991) und (iii) unterschiedliche Prävalenzen in bestimmten ethnischen Bevölkerungsgruppen (Lowe et al., *Inflamm Bowel Dis* 2009; Orholm et al., *N Engl J Med* 1991) dokumentiert werden. Darüber hinaus haben genomweite Assoziationsstudien an großen Patientenkollektiven hypothesenfrei mehr als 200 genetische Loci mit einem erhöhten Risiko für CED identifiziert, was eine polygenetische Ätiologie vermuten lässt (de Lange et al., *Nat Genet* 2017; Franke et al., *Nat Genet* 2010; Huang et al., *Nature* 2017; Imielinski et al., *Nat Genet* 2009; Jostins et al., *Nature* 2012; Kugathasan et al., *Nat Genet* 2008; Liu et al., *Nat Genet* 2015). Dabei haben die genomweiten Assoziationsstudien die Relevanz zahlreicher Signalprozesse mit unterschiedlichen biologischen Funktionen in der Pathogenese von CED aufgezeigt. So konnten exemplarisch Polymorphismen in Genen identifiziert werden, die die intrazelluläre Pathogenerkennung (z.B. *NOD2/CARD15*), Th17-assoziierten Signalprozesse (z.B. *IL23*, *CCR6*, *JAK2*, *STAT3*), Autophagie (z.B. *ATG16L1*, *LRRK2*, *IRGM*), Integrität der intestinalen Epithelbarriere (z.B. *IBD5*, *DLG5*, *PTGER4*, *ITLN1*, *DMBT1*) und endoplasmatischen Stressreaktionen (z.B. *XBPI*) regulieren (de Lange et al., *Nat Genet* 2017; Franke et al., *Nat Genet* 2010; Huang et al., *Nature* 2017; Imielinski et al., *Nat Genet* 2009; Jostins et al., *Nature* 2012; Kugathasan et al., *Nat Genet* 2008; Liu et al., *Nat Genet* 2015). Die genomweiten Assoziationsstudien haben viele bedeutende Hypothesen generiert und zahlreiche genetische Signaturen aufgeklärt, jedoch bleiben die meisten Studien assoziativ und die klinische Relevanz wird weiterhin kontrovers diskutiert (Huang et al., *Nature* 2017).

Umwelteinflüsse und mikrobielle Dysbalance bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Substantielle Unterschiede in geographischen Prävalenzen und eine zunehmende globale Inzidenz in den vergangenen Jahrzehnten mit einem Anstieg in asiatischen Schwellenländern bzw. bei Migranten in industrialisierten Ländern weisen auf einen kritischen Zusammenhang mit dem westlichen Lebensstil (z. B. Diät, Hygiene) und Umweltfaktoren in der Pathogenese der CED hin (Ananthakrishnan et al., *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018). Umweltfaktoren können über eine Vielzahl an komplexen Wechselwirkungen die Zusammensetzung der Darmbakterien beeinflussen. Veränderungen der Darmflora mit einem Ungleichgewicht von symbiotischen und pathologischen Mikroorganismen spielen dabei als Trigger oder Stimulus eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungsprozessen. Dementsprechend konnte bei Patienten mit CED eine gestörte Diversität und Zusammensetzung der Darmflora (Dysbiose) nachgewiesen werden (Neurath, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020). Obwohl die komplexen Mechanismen ungeklärt bleiben, stellt das Mikrobiom ein attraktives Target zur Behandlung der CED dar. So gehören enterale Ernährungstherapien, antibiotische Therapien und die Behandlung mit Probiotika bereits zum therapeutischen Repertoire bei CED-Patienten.

Dysfunktionen des Immunsystems bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die intestinale Epithelbarriere stellt als Schutzschicht eine Verteidigungslinie des Körpers gegenüber Pathogenen dar. Eine erhöhte Permeabilität der Darmwand kann zu einer Invasion von Mikroorganismen und einer fehlgeleiteten Immunabwehr führen. Zur Aufrechterhaltung der intestinalen Immunität und Toleranzentwicklung gegenüber Bakterien, ist ein ausgewogenes Gleichgewicht der komplexen angeborenen und erworbenen Immunreaktionen mit einer Vielzahl von spezialisierten Immunzellen und Zytokinen nötig (Sun et al., *Mucosal Immunol* 2015). So spielen dendritische Zellen und Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen durch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Aktivierung des adaptiven Immunsystems eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CED. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen differenzieren naive T-Zellen in spezialisierte T-Helferzellen (z. B. Th1-, Th2- und Th17-Zellen). Eine gestörte Balance der Differenzierung von T-Helferzellen wird als eine wichtige Ursache in der Krankheitsprogression der CED angesehen (Neurath, *Nat Immunol* 2019). Während eine verstärkte mukosale Th1-vermittelte Immunantwort insbesondere bei Patienten mit Morbus Crohn beobachtet wird (Vitale et al., *PLoS One* 2017), zeigen intestinale T-Zellen von Patienten mit Colitis ulcerosa eine erhöhte Sekretion von Th2-assoziierten Zytokinen (z.B. IL-5 und IL-13) (Heller et al., *Gastroenterology* 2005). In der

Praxis ist diese starre Unterteilung in eine Th1- oder Th2-vermittelte Pathogenese aufgrund der dynamischen Komplexität der intestinalen Immunität nicht möglich und die Pathogenese umfasst das Zusammenspiel einer Vielzahl von weiteren spezialisierten Immunzellen. Unter anderem haben zahlreiche Studien gezeigt, dass Th-17-assoziierte Immunantworten einerseits eine entscheidende Funktion in der Elimination von Bakterien und Pilzen im Bereich der Schleimhautbarriere spielen, aber andererseits Th17-assoziierte Zytokine intestinale Entzündungsreaktionen verstärken können (Tesmer et al., *Immunol Rev* 2008). Eine weitere zentrale Funktion in der Regulation der intestinalen Immunität nehmen regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) ein. Die Treg-Zellen hemmen pathogene T-Effektorzellen und unterdrücken Autoimmunprozesse durch verschiedene kontaktabhängige (z. B. CTLA-4, Perforin, Granzyme) und kontaktunabhängige (z. B. IL-10, TGF- β , CD39) Mechanismen, die beispielsweise die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen, die Differenzierung und Funktionen von Antigen-präsentierenden Zellen, die Zytolyse und verschiedene Stoffwechselprozesse modulieren (Sakaguchi et al., *Nat Rev Immunol* 2010; Vignali et al., *Nat Rev Immunol* 2008). Dysfunktionen von Treg-Zellen führen zu einer schweren Immundysregulation, Autoimmunität und intestinalen Enteropathie (Bennett et al., *Nat Genet* 2001; Brunkow et al., *Nat Genet* 2001; Wildin et al., *Nat Genet* 2001). Daneben erfordert die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase spezialisierte Subpopulationen von B-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, Granulozyten, und angeborenen lymphoiden Zellen (engl., *innate lymphoid cells*). Die Relevanz fehlgeleiteter Immunantworten in der Pathogenese der CED wird durch die Wirksamkeit von Biologika in der Behandlung von CED-Patienten verdeutlicht. So modulieren aktuelle Therapieregime bei CED-Patienten das Immunsystem beispielsweise durch die Blockade des pro-inflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor (engl., *tumor necrosis factor*, TNF- α ; Infliximab), der $\alpha 4\beta 7$ -Integrine (Vedolizumab), oder der IL-12/IL-23-Zytokinachse (Ustekinumab) (Neurath, *Nat Rev Immunol* 2014).

1.3 Frühkindliche Verlaufsformen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Pathogenese und die Krankheitsverläufe von CED sind heterogen und weisen substantielle altersabhängige Charakteristika auf. Das Hauptmanifestationsalter der CED liegt zwar zwischen dem 20. - 40. Lebensjahr, jedoch können CED in jedem Lebensalter auftreten (Molodecky et al., *Gastroenterology* 2012). So entwickeln 25 % der Patienten intestinale Entzündungsreaktionen vor dem Erwachsenenalter (Benchimol et al., *Inflamm Bowel Dis* 2011). Auf Basis der Erhebung einer gesetzlichen Krankenkasse ist eine Inzidenz der pädiatrischen CED von 17,41 pro 100.000 Kinder in Deutschland berechnet worden, so dass

eine jährliche Neuerkrankungsrate von ca. 800 - 1500 Kindern und Jugendlichen abgeschätzt werden kann (Wittig et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019). In seltenen Verlaufsformen entwickeln Patienten eine frühkindliche CED mit einem Manifestationsalter unter 6 Jahren (engl., *very early onset inflammatory bowel disease*) (Uhlig, *Gut* 2013). Eine systematische Meta-Analyse von 139 publizierten Studien hat jedoch gezeigt, dass insbesondere die Inzidenz (4,37 auf 100.000 Kinder) und Prävalenz (14 auf 100.000 Kinder) von frühkindlichen Verlaufsformen in einem dramatischen Ausmaß im Zeitraum von 1950 bis 2009 weltweit zugenommen haben (Benchimol et al., *Inflamm Bowel Dis* 2011).

Das klinische Erscheinungsbild kann sich bei frühkindlichen Verlaufsformen im Gegensatz zu Manifestationen im Erwachsenenalter deutlich unterscheiden. So werden vornehmlich eine ausgeprägte Krankheitsaktivität, eine schnellere Krankheitsprogression, ein häufigeres Auftreten von perianalen Krankheitsbeteiligungen und altersspezifische Komplikationen (z.B. Wachstumsretardierung, Pubertätsverzögerung) beobachtet. Darüber hinaus zeigen Patienten mit frühkindlichen CED eine erhöhte Frequenz an unklassifizierbaren Verlaufsformen (IBD-U) sowie häufig Krankheitsverläufe, die nicht auf konventionelle Therapien ansprechen. Daher sind bei Kleinkindern mit CED häufig stationäre Behandlungen und chirurgische Interventionen erforderlich (Gower-Rousseau et al., *Am J Gastroenterol* 2009; Turner et al., *Gut* 2008; Van Limbergen et al., *Gastroenterology* 2008; Vernier-Massouille et al., *Gastroenterology* 2008). Zusammenfassend hat die Diagnose einer frühkindlichen CED mit chronisch-rezidivierenden Verläufen weitreichende, lebenslange Konsequenzen für die heranwachsenden Kinder und gefährdet die körperliche und psychosoziale Entwicklung (Buderus et al., *Dtsch Arztebl Int* 2015). Daher stellt die frühzeitige Diagnose und effektive Behandlung von Patienten mit frühkindlichen CED eine große Herausforderung dar.

1.4 Diagnostik der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Diagnostik bei Kindern mit CED folgt wie bei Erwachsenen einem Stufenschema (Nikolaus and Schreiber, *Gastroenterology* 2007). Als Grundvoraussetzung erfolgt zunächst die Anamnese, die klinische Untersuchung mit der Erhebung von anthropometrischen Daten und die laborchemische Diagnostik zur Abschätzung der Entzündungsaktivität. Zur Diagnosesicherung erfolgt als Goldstandard die endoskopische Untersuchung (Ösophagogastroduodenoskopie, Koloskopie) und histologische Beurteilung von Stufenbiopsien. Neben einer sonographischen Untersuchung können als zusätzliche bildgebende Verfahren eine Magnetresonanztomographie-Enterographie oder

Videokapselendoskopie zur Darstellung von entzündlichen Läsionen und Stenosen in den nicht mittels Endoskopie einzusehenden Dünndarmabschnitten erfolgen.

Die konventionelle Diagnostik ermöglicht eine klinisch relevante Einteilung (Morbus Crohn versus Colitis ulcerosa) zur Therapieentscheidung, jedoch bleiben die molekularen Krankheitsursachen ungeklärt und es können bisher keine maßgeschneiderten Therapien für die Patienten abgeleitet werden.

1.5 Die therapeutische Behandlung von pädiatrischen Verlaufsformen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Das Ziel der Behandlung von Patienten mit CED besteht in der Heilung der Epithelschleimhaut und Kontrolle der Entzündungsaktivität, um eine nachhaltige klinische Remission zu induzieren, Komplikationen zu verhindern und die Lebensqualität zu verbessern. Dies erfordert differenzierte Therapiestrategien, welche an den individuellen Krankheitsverlauf adaptiert werden sollten, sowie gegebenenfalls interdisziplinäre Zusammenarbeiten. Die leitliniengerechte, medikamentöse Therapie zur Remissionsinduktion und Erhaltungstherapie folgt dabei klinisch gesteuerten Therapiealgorithmen (Ruemmele et al., *J Crohns Colitis* 2014; Turner et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012). Bei der Behandlung von Patienten mit frühkindlichen CED müssen dabei altersentsprechende Besonderheiten bezüglich der Therapieintensität und Medikamentenzulassung mit einem häufigem Off-Label-Gebrauch berücksichtigt werden, um insbesondere Wachstumsverzögerungen und eine Beeinträchtigung der Pubertätsentwicklung zu vermeiden.

Bei der Colitis ulcerosa kommen bei Patienten mit Proktitis oder einem isolierten rektalen Befall bzw. linksseitiger Colitis rein topische Applikationen von 5-Aminosalicylaten als Suppositorien, Klysmen, oder Rektalschaum zum Einsatz. Gegebenenfalls kann die Behandlung durch eine Kombinationstherapie mit topisch wirksamen Glukokortikoiden und systemischen 5-Aminosalicylaten bei ausgedehnter Krankheitsaktivität erweitert werden. Bei Therapieversagen oder höherer Entzündungsaktivität erfolgt eine Behandlung mit oralen Steroiden. Bei notwendiger Therapieeskalation werden Thiopurine (Azathioprin und 6-Mercaptopurin), Calcineurin-Inhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus) oder Biologika (z. B. Infliximab, Vedolizumab) angewandt. Zur Erhaltungstherapie werden 5-Aminosalicylate und *E. coli Nissle 1917* verwendet. Bei einem ausgedehnten Befall kann die remissionserhaltende Behandlung in Kombination mit Thiopurinen oder Biologika (z. B. Infliximab) (Turner et al., *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012) erfolgen.

Bei Kindern und Jugendlichen mit Morbus Crohn wird zur Remissionsinduktion als Therapie der ersten Wahl eine exklusive Ernährungstherapie in Form einer Trink- und Sondennahrung angewandt (Ruemmele et al., *J Crohns Colitis* 2014). Jedoch sollten Patienten mit perianaler Fistelbildung oder anderen Risikofaktoren primär mit Biologika (z. B. Infliximab) behandelt werden. Darüber hinaus haben weiterhin Steroide einen hohen Stellenwert in der Akuttherapie. Bei einem ileozökalen Befall kann als Alternative zu oralen Steroiden topisch wirksames Budesonid mit einem geringeren Nebenwirkungsprofil verabreicht werden. Zur Remissionsinduktion und Erhaltungstherapie für eine steroidfreie Remission werden zudem auch Immunsuppressiva (Thiopurine, Methotrexat) oder Biologika (z. B. Adalimumab, Infliximab) in Mono- oder Kombinationstherapie empfohlen.

Darüber hinaus werden gegenwärtig zahlreiche neue Therapiekonzepte für CED mit verschiedenen Wirkmechanismen evaluiert wie z.B. Modulatoren der Sphingosine-1-Phosphate, Janus kinase-Inhibitoren sowie monoklonale Antikörper gegen MAdCAM-1, $\alpha4/\beta7$ -Integrine, IL-6 oder die p19-Untereinheit von IL-23 (Neurath, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017). Bei schweren therapierefraktären Krankheitsverläufen müssen gegebenenfalls sowohl bei Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa chirurgische Interventionen in Erwägung gezogen werden.

Die gegenwärtigen leitliniengerechte Therapieprinzipien bedeuten einen großen Fortschritt und haben die Lebensqualität zahlreicher Patienten nachhaltig verbessert, jedoch sind die Wirkmechanismen weiterhin sehr unspezifisch und eine große Zahl an Patienten weist einen therapierefraktären Krankheitsverlauf auf.

2 Zielsetzung des Habilitationsprojekts

Patienten mit frühkindlicher CED weisen häufig schwere, therapierefraktäre Krankheitsverläufe auf, welche nicht auf konventionelle medikamentöse Therapien ansprechen. Darüber hinaus ist die Diagnose bei Kindern mit CED erschwert, da es sich um ein heterogenes Krankheitsbild handelt und eine höhere Zahl an Patienten nicht in die klassischen Verlaufsformen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eingeteilt werden kann (Uhlig, *Gut* 2013). Im Langzeitverlauf entwickeln Kinder mit CED häufig Begleiterkrankungen und Komplikationen mit strukturellen Darmschädigungen, so dass chirurgische Interventionen zum praxisrelevanten Therapierepertoire gehören. Des Weiteren zeigen Kinder häufig im Verlauf Nebenwirkungen im Rahmen der immunsuppressiven Therapien und weisen ein erhöhtes Malignitätsrisiko (z.B. Lymphome, Kolonkarzinom) auf. So gefährden die chronisch-rezidivierenden Krankheitsverläufe die körperliche bzw. psychosoziale Entwicklung der Kinder und beeinträchtigen nachhaltig die Lebensqualität.

Ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Krankheitsmechanismen ist unerlässlich, um für Patienten mit frühkindlicher CED (i) frühzeitige und definitive Diagnosen zu etablieren, (ii) Komplikationen im Krankheitsverlauf besser vorherzusagen, (iii) die Effektivität von verfügbaren Therapien besser abzuschätzen und (iv) innovative zielgerichtete Therapien zu entwickeln.

Vor dem Hintergrund der charakteristischen Krankheitsmerkmale und des frühen Manifestationsalters ist bei Kleinkindern mit CED bereits zuvor eine höhere genetische Belastung angenommen worden, da beispielsweise umweltbedingte Einflüsse noch nicht in demselben Maße wie bei Erwachsenen zur Pathogenese beitragen. Im Rahmen dieses Habilitationsprojekts haben wir die Hypothese verfolgt, dass frühkindliche Verlaufsformen der CED durch monogenetische Erkrankungen verursacht sein können. Das übergeordnete Ziel des Habilitationsprojekts bestand darin, genetische und immunologische Signaturen der frühkindlichen CED unter Verwendung genetischer Hochdurchsatzsequenzierungen zu entschlüsseln und zugrundeliegende molekulare Krankheitsmechanismen durch funktionelle Genomik aufzuklären.

Die experimentelle und translationale Habilitationsschrift verdeutlicht dabei eindrücklich die Relevanz einer innovativen genetischen Diagnostik in der klinischen Versorgung bei Patienten mit frühkindlicher CED.

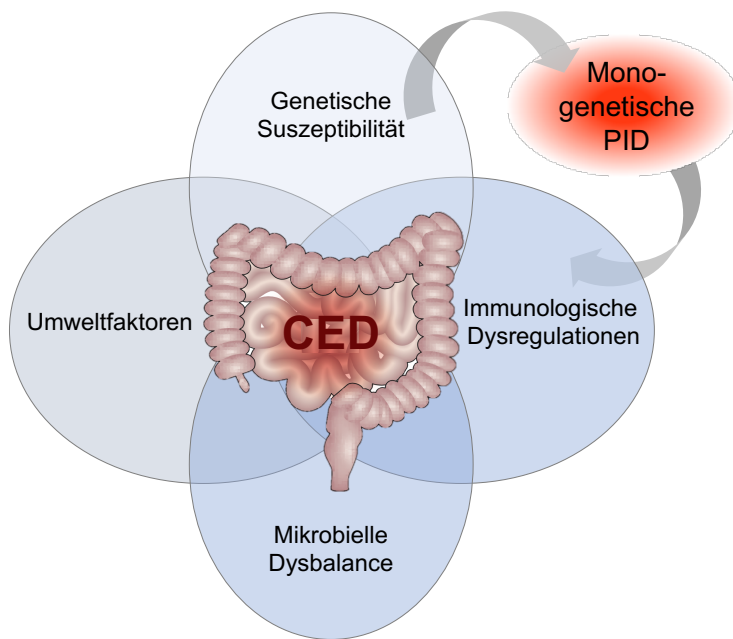


Abbildung 1. Graphische Hypothese: Monogenetische primäre Immundefizienzen als Ursache von frühkindlichen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED).

CED weisen eine komplexe und multifaktorielle Pathogenese auf. So triggern Umweltfaktoren, Veränderungen des Mikrobioms und Dysfunktionen der Immunität intestinale Entzündungsreaktionen in genetisch prädisponierten Individuen. Da Kinder mit einem sehr frühen Manifestationsalter häufig einen distinkten und schweren Krankheitsverlauf zeigen, haben wir die Hypothese verfolgt, dass Patienten mit frühkindlichen Verlaufsformen der CED eine erhöhte genetische Belastung aufweisen und Umweltfaktoren einen geringeren Einfluss in der Pathogenese als bei Erwachsenen haben. Hierbei haben wir insbesondere postuliert, dass frühkindliche CED durch monogenetische primäre Immundefizienzen (PID) verursacht sein können.

3 Teilprojekte und Bedeutung der Forschungsarbeiten für das Fachgebiet

3.1 Identifizierung von Patienten mit monogenetischen IL-10R-Defizienzen – Ein Paradigmenwechsel in der translationalen Erforschung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Glocker EO*, **Kotlarz D***, Boztug K*, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, and Klein C (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361, 2033-2045. IF: 47,1. (* equal contribution)

Dieses translationale Forschungsprojekt hat seinen Ausgangspunkt von Indexpatienten mit lebensbedrohlichen Verlaufsformen der frühkindlichen CED genommen. Diese Kinder zeigten eine therapierefraktäre Enterokolitis, die insbesondere durch (i) ein sehr frühes Manifestationsalter innerhalb der ersten Lebensmonate, (ii) eine ausgeprägte perianale Krankheitsbeteiligung (Abszesse, Fisteln), (iii) rezidivierendes Fieber bzw. rezidivierende Infektionen und (iv) einen schweren Krankheitsverlauf mit häufigeren stationären Krankenhausaufenthalten und chirurgischen Interventionen gekennzeichnet waren.

Genomweite Assoziationsstudien hatten in der Vergangenheit bereits zahlreiche genetische Loci, inklusive *IL10*, mit einer erhöhten Suszeptibilität für CED identifiziert (de Lange et al., *Nat Genet* 2017; Franke et al., *Nat Genet* 2010; Huang et al., *Nature* 2017; Imielinski et al., *Nat Genet* 2009; Jostins et al., *Nature* 2012; Kugathasan et al., *Nat Genet* 2008; Liu et al., *Nat Genet* 2015). Vor dem Hintergrund der charakteristischen Krankheitsmerkmale und des frühen Manifestationsalters haben wir in dieser Forschungsarbeit die Hypothese verfolgt, dass Kleinkinder mit CED eine höhere genetische Belastung aufweisen, da beispielsweise umweltbedingte Einflüsse noch nicht in demselben Maße wie bei Erwachsenen zur Pathogenese beitragen.

Unter Anwendung von genomweiten Kopplungsanalysen und nachfolgender DNA-Sequenzierung einzelner Kandidatengene konnten wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bodo Grimbacher (University College London, England) bei vier Patienten „*loss of function*“-Mutationen in den Genen für die Interleukin-10-Rezeptor-

Untereinheiten (IL-10RA und IL-10RB) identifizieren. Bei IL-10 handelt es sich um ein hochpotentes immunregulatorisches Zytokin mit pleiotropen, anti-inflammatorischen Wirkungen. Interessanterweise konnte bereits in vorherigen Studien demonstriert werden, dass IL-10-defiziente Mäuse eine schwere intestinale Inflammation in Abhängigkeit vom Mikrobiom entwickeln (Kuhn et al., *Cell* 1993). Darüber hinaus sind Dysregulationen in der IL-10-vermittelten Signalkaskade bereits bei zahlreichen infektiösen, immunologischen, allergischen und malignen Erkrankungen kontrovers diskutiert worden, jedoch blieb die klinische Relevanz einer IL-10-defekten Signaltransduktion im humanen System ungeklärt (Sabat et al., *Cytokine Growth Factor Rev* 2010). Unsere IL-10R-defizienten Patienten manifestierten sich primär mit einer frühkindlichen CED und damit verdeutlichten unsere Studien die essentielle Funktion von IL-10 in der Regulierung der humanen intestinalen Immunität. Experimentelle Analysen zeigten, dass die defekte IL-10R-vermittelte Signaltransduktion zu einer pro-inflammatorischen Entzündungsreaktion in peripheren mononukleären Blutzellen (PMBZ) führt. Unter Verwendung eines Zytokinarrays konnten wir darlegen, dass IL-10R-defiziente Zellen nach Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) eine erhöhte Sekretion von zahlreichen inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP1, RANTES, TNF- α , TGF- β 1) aufweisen. Diese experimentellen Daten lieferten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Pathomechanismen der IL-10R-Defizienz und eine potentielle Erklärung, weshalb Monotherapien mit Biologika (z. B. anti-TNF-Medikamenten) bei IL-10R-defizienten Patienten keine langfristige Remission induzieren können.

Vor dem Hintergrund des therapierefraktären Verlaufs, der molekulargenetischen Aufschlüsselung des zugrundeliegenden Gendefekts und dem Wissen, dass IL-10 im Wesentlichen anti-inflammatorische Effekte an Immunzellen vermittelt, konnten wir eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) als individuellen Heilversuch bei einem IL-10R-defizienten Indexpatienten durchführen. Erfreulicherweise konnte durch den erstmaligen rationalen Einsatz einer HSZT bei CED eine nachhaltige Remission bei unserem Indexpatienten induziert werden.

Zusammenfassend haben unsere paradigmatischen Studien verdeutlicht, dass (i) IL-10 eine zentrale Rolle in der Regulierung der intestinalen Homöostase spielt, (ii) frühkindliche CED ein geeignetes „Modellsystem“ zur Erforschung von essentiellen regulatorischen Signalwegen der humanen intestinalen Immunität darstellen und (iii) innovative genetische Diagnostikverfahren eine direkte therapeutische Relevanz für Kinder mit CED aufweisen.

3.2 Hämatopoetische Stammzelltransplantationen als kurative Behandlung für CED-Patienten mit IL-10- und IL-10R-Defizienzen

Kotlarz D*, Beier R*, Murugan D*, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, Pfeifer D, Kreipe H, Pfister ED, Baumann U, Puchalka J, Bohne J, Egritas O, Dalgic B, Kolho KL, Sauerbrey A, Buderus S, Gungor T, Enninger A, Koda YK, Guariso G, Weiss B, Corbacioglu S, Socha P, Uslu N, Metin A, Wahbeh GT, Husain K, Ramadan D, Al-Herz W, Grimbacher B, Sauer M, Sykora KW, Koletzko S, and Klein C (2012). Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 143, 347-355. IF: 12,8. (* equal contribution)

Murugan D, Albert MH, Langemeier J, Bohne J, Puchalka J, Jarvinen PM, Hauck F, Klenk AK, Prell C, Schatz S, Diestelhorst J, Sciskala B, Kohistani N, Belohradsky BH, Muller S, Kirchner T, Walter MR, Bufler P, Muise AM, Snapper SB, Koletzko S, Klein C, and **Kotlarz D#** (2014). Very early onset inflammatory bowel disease associated with aberrant trafficking of IL-10R1 and cure by T cell replete haploidentical bone marrow transplantation. *J Clin Immunol* 34, 331-339. IF: 3,2. (# corresponding author)

Unserer Arbeitsgruppe ist es erstmals gelungen, monogenetische IL-10R-Defizienzen als Ursache für schwere Verlaufsformen der frühkindlichen CED zu identifizieren ((Glocker et al., *N Engl J Med* 2009); siehe 3.1). In einem initialen Heilversuch konnten wir bei einem Indexpatienten zeigen, dass eine allogene HSZT potentiell eine klinische Remission bei IL-10R-defizienten Kindern induzieren kann. In unserer Follow-up-Studie an einer größeren internationalen Kohorte von 66 Patienten mit frühkindlichen CED haben wir das Vorkommen und den klinischen Phänotyp von IL-10- und IL-10R-defizienten Patienten sowie die Behandlung der IL-10R-Defizienz mittels HSZT näher untersucht.

Unter Verwendung von klassischen Kandidatengensequenzierungen (Sanger-Sequenzierung) konnten wir 16 Kinder mit einer beeinträchtigten IL-10-vermittelten Signalkaskade identifizieren (3 IL-10-, 5 IL-10RA- und 8 IL-10RB-defiziente Patienten). Unsere Studien an dieser Kohorte verdeutlichten, dass alle IL-10 bzw. IL-10R-defizienten Patienten erste klinische Manifestationen der frühkindlichen CED innerhalb der ersten drei Lebensmonate zeigten. Klinisch war die therapierefraktäre schwere Kolitis bei IL-10- oder IL-10R-defizienten Patienten mit Gedeihstörung (15/16), rekurrenten Fieberepisoden bzw.

Infektionen (15/16), blutigen Diarrhoen (16/16) und perianalen Abszessen (13/16) bzw. Fisteln (13/16) assoziiert. Extraintestinale Manifestationen umfassten orale aphthöse Läsionen (4/16), Follikulitis (11/16) und Arthalgien bzw. Arthritiden (4/16). Unsere Studien konnten keine eindeutigen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen definieren, jedoch haben sie erste genauere Einblicke in das klinische Spektrum der IL-10R-Defizienz geliefert. So konnte unsere Studie ein frühes Manifestationsalter innerhalb der ersten Lebensmonate, eine schwere perianale Krankheitsbeteiligung und eine Follikulitis als wesentliche Charakteristika aufzeigen, die unbedingt eine genetische Abklärung einer IL-10 bzw. IL-10R-Defizienz bedürfen.

Darüber hinaus konnten im Rahmen unserer Studie die Sicherheit und Effektivität einer allogenen HSZT als kausales Therapieverfahren der IL-10R-Defizienz bei fünf Kindern verdeutlicht werden, denn alle behandelten Patienten zeigten eine nachhaltige Remission mit einem medianen Follow-up von 2 Jahren (Kotlarz et al., *Gastroenterology* 2012). In einer Folgestudie konnte wir zudem die Effektivität einer haploidentischen HSZT als alternatives Therapieverfahren bei fehlenden HLA-identischen Spendern demonstrieren (Murugan et al., *J Clin Immunol* 2014).

Zusammenfassend haben unsere translationalen Forschungsarbeiten wichtige Einblicke in den klinischen Phänotyp, die klinische Diagnose und die kurative Behandlung mittels HSZT von IL-10R-defizienten Patienten geliefert. Hierbei stellten unsere Studien zudem die Grundlage für die funktionelle Routinediagnostik von IL-10R-defizienten Patienten dar (IL-10-vermittelte STAT3-abhängige Signalkaskade und Inhibierung der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen).

3.3 Die Identifizierung der biallelischen *TGFBI*-Defizienz als neue molekulare Ursache für frühkindliche chronisch-entzündliche Darmerkrankungen betont die essentielle Funktion von TGF- β 1 in der Regulierung der intestinalen Homöostase

Kotlarz D*, Marquardt B*, Barøy T, Lee WS, Konnikova L, Hollizeck S, Magg T, Lehle AS, Walz C, Borggraefe I, Hauck F, Bufler P, Conca R, Wall S, Schumacher EM, Misceo D, Frengen E, Bentsen BS, Uhlig H, Hopfner K-P, Muise AM, Snapper SB, Strømme P, Klein C (2018). Human TGF- β 1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy. *Nature Genetics* 50, 344–348. IF: 27,1. (* equal contribution)

Humanes *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β 1) ist ein seit vielen Jahrzehnten bekanntes Zytokin, das grundlegende Zellfunktionen in der Embryogenese und im adulten Organismus reguliert (Blobe et al., *N Engl J Med* 2000; Wu and Hill, *Dev Cell* 2009). Das enorme Forschungsinteresse an der TGF-beta-Superfamilie in der Biomedizin wird durch mehr als 72.000 wissenschaftliche Referenzen in der Datenbank PubMed dokumentiert. Trotz des großen Forschungsinteresses wird jedoch die Funktion von TGF- β 1 in der Regulation der Embryogenese und Aufrechterhaltung der postnatalen Gewebekomöostase sowie in der Pathogenese humaner Erkrankungen weiterhin kontrovers diskutiert. Aufgrund der hohen funktionellen Relevanz von TGF- β 1 sind Dysfunktionen in der TGF- β 1-vermittelten Signaltransduktion bereits mit vielen humanen Erkrankungen (z.B. Krebserkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Entwicklungsstörungen) assoziiert worden (Blobe et al., *N Engl J Med* 2000). Darüber hinaus konnte bereits ein direkter kausaler Zusammenhang einer gestörten TGF- β 1-Signaltransduktion in der Krankheitsentstehung durch die Aufklärung von monogenetischen Defekten aufgezeigt werden. So führt beispielsweise eine erhöhte Aktivität des TGF- β 1-Signalwegs bedingt durch Mutationen in den *TGFBR1*- und *TGFBR2*-Genen zu einer Bindegewebserkrankung, die typischerweise mit Gefäßanomalien (Aortenaneurysma) und Skelettveränderungen einhergeht (Loeys-Dietz-Syndrom) (Loeys et al., *Nat Genet* 2005). Darüber hinaus sind bereits heterozygote *gain-of-function*-Mutationen im *TGFBI*-Gen als Ursache für die Camurati-Engelmann-Krankheit beschrieben worden (Janssens et al., *J Med Genet* 2006), wobei es sich um ein Knochendysplasie-Syndrom mit Hyperostose der langen Knochen, des Schädels, der Wirbelsäule und des Beckens handelt. Diese monogenetischen Erkrankungen haben die zentrale Funktion von TGF- β 1 in der Regulierung der extrazellulären

Matrix, Bindegewebesynthese und Knochenmorphologie aufgezeigt, jedoch konnten anhand dieser Studien keine direkten Zusammenhänge für immunologische und inflammatorische Erkrankungen abgeleitet werden.

In unserem Forschungsprojekt konnten wir erstmals biallelische *loss-of-function*-Mutationen im *TGFBI*-Gen als neue monogenetische Krankheitsursache nachweisen. Interessanterweise zeigten unsere drei Patienten eine schwere therapierefraktäre, infantile CED und neurologische Entwicklungsstörungen mit Epilepsie, Hirnatrophie und/oder posteriorer Leukoenzephalopathie.

Die Immunphänotypisierung von PBMZ unseres Indexpatienten zeigte eine relative Verringerung von aktivierten regulatorischen T (Treg)-Zellen und eine beeinträchtigte Differenzierung von $CCR6^{-}CXCR3^{+}$ Th1-Helferzellen und $CCR6^{+}CXCR3^{-}$ Th17-Helferzellen. Weiterführende CyTOF-Analysen von intestinalen Lamina propria mononukleären Zellen (LPMZ) des Indexpatienten zeigten eine reduzierte Frequenz von $FOXP3^{+}$ Treg-Zellen, Th17-Zellen, und $CD103^{+}$ T-Zellen. Des Weiteren konnte eine reduzierte T-Zellaktivierung nach Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 und T-Zellproliferation als Reaktion auf spezifische Antigenstimulation beobachtet werden. Die funktionelle Relevanz der identifizierten Mutationen konnte durch verschiedene biochemische und zellbiologische Analysen an Patientenzellen oder heterologen Zellmodellen mit lentiviral-vermittelter Überexpression der mutierten *TGFBI*-Allele validiert werden. So konnten beispielsweise eine beeinträchtigte Sekretion, Funktion, Stabilität und Bioverfügbarkeit der mutierten *TGFBI*-Varianten nachgewiesen werden. Dementsprechend konnten CyTOF-Analysen eine verringerte SMAD2/3-Phosphorylierung in intestinalen LPMZ unseres Indexpatienten detektieren, was auf beeinträchtigte Bioverfügbarkeit der TGF- β 1-vermittelten Signaltransduktion *in situ* hindeutet.

Zusammenfassend präsentierte unsere Studie erstmals Patienten mit einer biallelischen *TGFBI*-Defizienz und zeigte damit die essentielle Funktion von TGF- β 1 in der Regulierung des humanen mukosalen Immunsystems und der neurologischen Entwicklung auf. Des Weiteren verdeutlichte unsere Studie, dass genomweite Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologien eine unverzerrte Gendiagnostik mit hoher diagnostischer Sensitivität ermöglichen. Die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Krankheitsursachen bildet die Grundlage zur Etablierung innovativer und personalisierter Therapien von Patienten mit CED.

3.4 Monogenetische CASP8-Defizienzen unterstreichen die essentielle Funktion von CASP8 als Regulator der humanen intestinalen Homöostase

Lehle AS, Farin HF, Marquardt B, Michels BE, Magg T, Li Y, Liu Y, Ghalandary M, Lammens K, Hollizeck S, Rohlfs M, Hauck F, Conca R, Walz C, Weiss B, Lev A, Simon AJ, Groß O, Gaidt MM, Hornung V, Clevers H, Yazbeck N, Hanna-Wakim R, Shouval DS, Warner N, Somech R, Muise AM, Snapper SS, Bufler P, Koletzko S, Klein C*, **Kotlarz D*[#]** (2019). Intestinal Inflammation and Dysregulated Immunity in Patients with Inherited Caspase-8 Deficiency. *Gastroenterology*, 156, 275-278. IF: 20,9. (* equal contribution, [#] corresponding author)

Caspase-8 (CASP8) ist eine Cysteinprotease (engl., *cysteiny aspartate-specific protease*), die eine essentielle Rolle in der Regulierung von programmierten Zelltodreaktionen (Apoptose und Nekroptose) spielt (Oberst and Green, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011). Darüber hinaus haben Mausstudien gezeigt, dass CASP8 wichtige Funktionen in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen im Rahmen von Infektionen oder Gewebeschädigungen übernimmt (Ben Moshe et al., *Hepatology* 2007; Gunther et al., *Nature* 2011; Kovalenko et al., *J Exp Med* 2009). Interessanterweise führt ein konditionaler Knockout von *Casp8* in intestinalen Epithelzellen zu einer spontanen Ileitis im Mausmodell (Gunther et al., *Nature* 2011). Dementsprechend sind Dysfunktionen von Caspasen bereits als potentielle Trigger für intestinale Entzündungsreaktionen und kolorektale Karzinome diskutiert worden (Becker et al., *Gastroenterology* 2013), jedoch blieb die klinische Relevanz bisher unklar.

Die essentielle Rolle von CASP8 in der Regulierung der humanen Immunität ist erstmals durch die Identifizierung von zwei Patienten, welche ein autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom (ALPS) und homozygote Keimbahnmutation im *CASP8*-Gen aufweisen, dokumentiert worden (Chun et al., *Nature* 2002). In unserer Forschungsarbeit konnten wir erstmals zeigen, dass homozygote Missense-Mutationen im *CASP8*-Gen eine frühkindliche CED verursachen können. Eine detaillierte Immunophänotypisierung konnte eine gestörte Differenzierung, Aktivierung und/oder Proliferation von T- und B-Zellen nachweisen. Darüber hinaus konnten wir als Zeichen einer gestörten angeborenen Immunabwehr eine erhöhte Aktivierung von Inflammasomen in Patienten-abgeleiteten Makrophagen und heterologen BLaER1-abgeleiteten monozytären Zellmodellen mit einem CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout von *CASP8* oder lentiviraler Überexpression der Mutation unseres Indexpatienten

detektieren. Durch die Anwendung von kleinmolekularen Inhibitoren (*small molecules*) konnten eine erhöhte NLRP3-Aktivität und MLKL-abhängige Nekroptose als mögliche Pathomechanismen für die proinflammatorischen Zellreaktionen in CASP8-defizienten Makrophagen darlegt werden. Neben den adaptiven und angeborenen Immundefunktionen konnten wir zudem intrinsische Funktionsstörungen in intestinalen Epithelzellen nachweisen. So zeigten Patienten-abgeleitete intestinale Organoide (*3D mini-guts*) eine aufgehobene TRAIL-vermittelte Apoptose und eine erhöhte Aktivierung der Nekroptose.

Interessanterweise konnten wir trotz des vergleichbaren Phänotyps bei unseren Patienten substantielle Spezies-spezifische Unterschiede im Vergleich zu Mäusen mit einem konditionalen Knockout von *Casp8* in intestinalen Epithelzellen detektieren. Während CASP8-defiziente Mäuse eine TNF-abhängige terminale Ileitis entwickelten, welche mit einer erhöhten RIPK3-Expression assoziiert war (Gunther et al., *Nature* 2011), zeigten unsere Patienten (i) eine chronische Entzündung des Kolons, (ii) normale Expressionslevel von RIPK1 oder RIPK3 und (iii) keine langfristige klinische Remission nach medikamentöser TNF-Blockade.

Zusammenfassend zeigten unsere Forschungsarbeiten die CASP8-Defizienz als neue genetische Entität für frühkindliche CED auf und verdeutlichten die essentielle Rolle von CASP8 in der Regulierung der humanen Immunität, Inflammation und Integrität der intestinalen Epithelbarriere.

3.5 Monogenetische RIPK1-Defizienzen demonstrieren die essentielle Rolle von RIPK1 in der Regulierung der humanen Immunität und intestinalen Inflammation

Li Y, Führer M, Bahrami E, Socha P, Klaudel-Dreszler M, Bouzidi A, Liu Y, Lehle AS, Magg T, Hollizeck S, Rohlf M, Conca R, Field M, Warner N, Mordechai S, Shteyer E, Turner D, Boukari R, Belbouab R, Walz C, Gaidt M, Hornung V, Baumann B, Pannicke U, Al Idrissi E, Alghamdi HA, Sepulveda F, Gil M, Saint Basile G, Hoenig M, Koletzko S, Muise AM, Snapper SB, Schwarz K*, Klein C*, **Kotlarz D***,# (2019). Human RIPK1 Deficiency Causes Combined Immunodeficiency and Inflammatory Bowel Diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 970-975. IF: 9,6. (* equal contribution, # corresponding author)

RIPK1 übernimmt zentrale Funktionen in der Regulierung zahlreicher zellulärer Stressreaktionen wie z. B. Infektionen, Entzündungen, Differenzierungsprozesse und Zelltodreaktionen (Ofengeim et al, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013). Ein konventioneller Knockout von *Ripk1* in Mäusen resultierte in einer perinatalen Letalität, die durch eine Hyperinflammation und gesteigerte Sensivität gegenüber TNF- α -vermittelten Zelltodreaktionen verursacht wird (Kelliher et al, *Immunity* 1998). Interessanterweise entwickelten Mäuse mit einem konditionalen Knockout von *Ripk1* schwere intestinale Entzündungen, welche mit einer erhöhten FADD/CASP8-abhängigen Aktivierung der Apoptose assoziiert war (Takahashi et al, *Nature* 2014; Dannappel et al, *Nature* 2014).

Kürzlich haben Erstbeschreibungen monogenetischer RIPK1-Defizienzen neue kritische Einblicke in die Funktion von humanem RIPK1 geliefert (Cuchet-Lourenço et al. 2018; Li et al. 2019; Uchiyama et al. 2019). Im Rahmen unseres genetischen Screens von insgesamt 1.942 Patienten mit frühkindlichen CED oder primären Immundefizienzen konnten wir acht Kinder (sechs nicht verwandte Familien) mit biallelischen Mutationen des *RIPK1*-Gens identifizieren. Während bei zwei Patienten mit einem kompletten Funktionsverlust des RIPK1-Proteins (*stop gain*- und *frameshift*-Mutationen) die Indikation zur genetischen Diagnostik vornehmlich aufgrund einer primären Immundefizienz gestellt worden war, zeigten sechs Patienten mit *Missense*-Mutationen in der *Death Domain* des RIPK1-Proteins primär klinische Symptome einer frühkindlichen CED. Alle Patienten wiesen Diarrhoen bzw. Gedeihstörungen auf und perianale Beteiligungen (Abszesse, Fisteln) wurden bei sieben Kindern beobachtet. Darüber hinaus zeigten alle Patienten eine erhöhte bakterielle und virale Infektneigung.

Die Immunphänotypisierung der PBMZ von fünf RIPK1-defizienten Patienten wiesen auf eine gestörte adaptive Immunfunktion hin. So konnten wir beispielsweise eine beeinträchtigte Differenzierung von $CD45RO^+CCR7^-$ Effektor-Gedächtnis-T-Lymphozyten, aktivierten $CD45RO^+HLA-DR^+$ Treg-Zellen, $CXCR3^+CCR6^-$ Th1-Helferzellen, $CXCR3^-CCR6^+$ Th17-Helferzellen und IgD^-CD27^+ Gedächtnis-B-Lymphozyten detektieren. Des Weiteren konnte ein Defekt der angeborenen Immunabwehr nachgewiesen werden, da Patienten-abgeleitete Monozyten und heterologe RIPK1-defiziente BLaER1 Makrophagen-ähnliche Zelllinien mit einem Knockout von *RIPK1* oder einer lentiviral-vermittelten Überexpression von mutierten RIPK1-Varianten eine veränderte Inflammation mit einer erhöhten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β nach LPS-Stimulation aufwiesen. Neben einer gestörten erworbenen und angeborenen Immunantwort konnten auch intrinsische Defekte in RIPK1-defizienten intestinalen Epithelzellen detektiert werden. So wiesen beispielsweise genetisch-modifizierte RIPK1-defiziente Kolonkarzinom-abgeleitete HCT116-Zelllinien eine reduzierte TNF- α -vermittelte NF- κ B Signaltransduktion auf. Weiterführend konnten wir als Korrelat gestörte TNF- α -induzierte Zelltodreaktionen (Apoptose, Nekroptose) in RIPK1-defizienten HT-29 intestinalen Epithelzellen nachweisen.

Unsere Forschungsergebnisse haben wichtige Einblicke für die Behandlung von RIPK1-defizienten Patienten geliefert. Parallele Studien von Cuchet-Lourenço et al. legten nahe, dass intestinale Entzündungen bei RIPK1-defizienten Patienten durch gestörte Zytokinsekretionen und Zelltodreaktionen von Immunzellen verursacht werden und durch HSZT behandelt werden könnten (Cuchet-Lourenco et al., *Science* 2018). Im Gegensatz dazu demonstrierte unsere Studie, dass RIPK1 auch essentielle, intrinsische Funktionen in der Regulierung humaner Zelltodreaktionen von intestinalen Epithelzellen aufweist, wobei epitheliale Dysfunktionen potentiell ähnlich wie bei NEMO-defizienten Patienten nicht durch eine HSZT geheilt werden können (Miot et al., *Blood* 2017). Zusammenfassend zeigen unsere Forschungsarbeiten, dass RIPK1-defiziente Kinder einen kombinierten Immun- und Epitheldefekt aufweisen.

Pharmakologische Inhibitoren von RIPK1 (GSK2982772, DNL747) werden bereits aufgrund von Mausstudien als potentiell Target zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen (z. B. chronische Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Colitis ulcerosa) in klinischen Studien evaluiert (Harris et al., *J Med Chem* 2017; Mullard, *Nat Rev Drug Discov* 2018). Unsere Studien an monogenetischen Erkrankungen liefern daher auch wichtige Einblicke, um die therapeutischen Effekte und das Nebenwirkungsprofil von RIPK1-Inhibitoren bei der Behandlung häufiger inflammatorischer Erkrankungen besser abzuschätzen.

3.6 Aufklärung grundlegender RNA-Splicingmechanismen des Interleukin-2-Rezeptors durch Charakterisierung einer seltenen und komplexen monogenetischen Form der IL2RG-Defizienz

Illig D, Navratil M, Kelečić J, Conca R, Hojsak I, Jadrešin O, Ćorić M, Vuković J, Rohlf M, Hollizeck S, Bohne J, Klein C*, **Kotlarz D*#** (2019). Alternative Splicing Rescues Loss of Common Gamma Chain Function and Results in IL-21R-like Deficiency. *J Clin Immunol* 39, 207-215. IF: 6,8. (* equal contribution, # corresponding author)

Die X-chromosomal vererbte Defizienz der “gemeinsamen γ -Kette“ des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R γ , γ_c) beeinträchtigt die Signaltransduktion der sechs essentiellen Zytokine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 (Rochman et al., *Nat Rev Immunol* 2009) und verursacht dadurch eine schwere kombinierte Immundefizienz (SCID) (Puck et al., *Blood* 1997).

In unserem Forschungsprojekt haben wir mittels unverzerrter Exomsequenzierung eine Deletion eines einzelnen Basenpaares im ersten Exon des *IL2RG*-Gens bei zwei Geschwistern mit chronischer Diarrhoe und Cholangitis vor dem Hintergrund einer chronischen Kryptosporidiosis nachgewiesen. Interessanterweise wiesen die Patienten einen Phänotyp vergleichbar mit einer isolierten IL-21R-Defizienz auf (Kotlarz et al., *J Exp Med* 2013). Dementsprechend zeigte die detaillierte Immunophänotypisierung der Patienten eine defekte B-Zelldifferenzierung, aber im Gegensatz zu anderen IL-2R γ -defizienten Patienten normale CD3⁺ T-, CD19⁺ B- und CD3⁻CD16⁺CD56⁺ NK-Zellzahlen (Puck et al., *Blood* 1997). Weiterführende Analysen zeigten überraschenderweise trotz der *Frameshift*-Mutation eine normale Zelloberflächenexpression des IL-2R γ . Während eine defekte IL-4- und IL-21-induzierte Phosphorylierung von *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und STAT6 in Patientenzellen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich nur eine geringe Reduktion der IL-2-, IL-7- und IL-15-abhängigen Signaltransduktion. Durch detaillierte Expressionsanalysen konnten wir einen alternativen *Splicing*-Mechanismus downstream des ersten Exons von *IL2RG* detektieren, was letztendlich zu einer Auflösung der *Frameshift*-Mutation und Translation eines Proteins mit 16 mutierten Aminosäuren führte.

Während die Zytokine IL-4, IL-7 und IL-21 an heterodimere Rezeptoren bestehend aus der IL-2R γ -Kette und einer spezifischen Untereinheit (IL-4R, IL-7R, and IL-21R) binden, sind die heterotrimeren IL-2- und IL-15-Rezeptorkomplexe aus einer α -, β - und γ_c -Untereinheit

aufgebaut (LaPorte et al., *Cell* 2008; Rickert et al., *Science* 2005; Ring et al., *Nat Immunol* 2012). Unsere Strukturanalysen lassen vermuten, dass die identifizierte Mutation die N-terminale Proteindomäne von IL-2R γ und dadurch insbesondere die Stabilisierung der Zytokinbindungen von IL-4 bzw. IL-21 an die IL-2R γ -Kette beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu haben vorangegangene Studien gezeigt, dass die α -Untereinheit der IL-2- und IL-15-Rezeptorkomplexe Funktionen in der Stabilisierung von Zytokinbindungen einnimmt. Daher postulieren wir, dass die α -Untereinheit in diesen Rezeptorkomplexen die Funktionsstörungen der mutierten N-terminalen Proteindomäne der IL-2R γ -Kette zumindest teilweise kompensieren kann, was potentiell die differentielle Störung der IL-2R γ -vermittelten Signaltransduktion erklären könnte.

Eine frühzeitige Erkennung von Patienten mit SCID ist von entscheidender Bedeutung für die Behandlung und Prognose, aber die definitive Diagnose kann durch hypomorphe Phänotypen verzögert oder übersehen werden, was zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann. Hochdurchsatz-Sequenzierungen bieten die Möglichkeit einer unverzerrten Gendiagnostik mit hoher diagnostischer Sensitivität. Unsere Studien haben jedoch verdeutlicht, dass es auch bei offensichtlichen monogenetischen Defekten essentiell ist, komplexere Pathomechanismen (z. B. alternatives Splicing, intronische Mutationen) zu berücksichtigen und die genetischen Befunde durch funktionelle Analysen zu validieren. In unserer Forschungsarbeit konnten wir zeigen, dass eine schwerwiegende Mutation durch alternative Splicing-Mechanismen partiell rekonstituiert werden kann und zu einem atypischen SCID-Phänotyp, der vergleichbar mit einer IL-21R-Defizienz ist, führen kann. Unsere Studien an einer sehr seltenen monogenetischen Verlaufsform einer atypischen SCID haben dabei grundlegende Einblicke in RNA-Splicingmechanismen des *IL2RG* geliefert.

3.7 CARMIL2-Defizienz als monogenetische Ursache für frühkindliche chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Magg T, Shcherbina A, Arslan D, Desai MM, Wall S, Mitsialis V, Conca R, Unal E, Karacabey N, Mukhina A, Rodina Y, Taur PD, Illig D, Marquardt B, Hollizeck S, Jeske T, Gothe F, Schober T, Rohlf M, Koletzko S, Lurz E, Muise AM, Snapper SB, Hauck F, Klein C, **Kotlarz D**[#] (2019). CARMIL2 Deficiency Presenting as Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 25, 1788-1795. IF: 4,0. ([#] corresponding author)

Das *cytosolic capping protein, Arp2/3 and myosin-I linker protein 2* (CARMIL2) übernimmt wichtige Funktionen in der Regulierung und Organisation des Zytoskeletts, der Endozytose und der Zellmigration (Edwards et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014). Mausstudien haben verdeutlicht, dass CARMIL2 eine kritische Funktion in der Vermittlung der CD28-Ko-Signalgebung in T-Zellen und Differenzierung von Treg-Zellen einnimmt (Liang et al., *Nat Immunol* 2013). In der Vergangenheit sind bereits biallelische Mutationen im *CARMIL2*-Gen als Ursache für kombinierte variable Immundefekte (engl. *common variable immunodeficiencies*) nachgewiesen worden, wobei die Patienten eine gesteigerte Suszeptibilität für Infektionen, allergische Reaktionen und EBV-positive Tumoren des glatten Muskelgewebes zeigten (Schober et al., *Nat Commun* 2017; Wang et al., *J Exp Med* 2016).

Während bisher publizierte CARMIL2-defiziente Patienten trotz einer gestörten Funktion von Treg-Zellen keine Zeichen einer Autoimmunität oder Inflammation zeigten, konnte unser genetisches Screening einer der größten internationalen Kohorten an Patienten mit frühkindlichen CED fünf Kinder von drei nichtverwandten Familien mit CARMIL2-Defizienz identifizieren. Eine detaillierte Immunophänotypisierung der PBMZ zeigte reduzierte Frequenzen von Treg-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sowie eine gestörte Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen. Darüber hinaus konnten wir eine gestörte Proliferation und Aktivierung von T-Zellen in Abhängigkeit der CD28-vermittelten Ko-Stimulation beobachten.

Unsere translationale Forschungsarbeit zeigte CARMIL2 als Kandidatengen bei Patienten für frühkindliche CED auf und erweiterte das klinische Spektrum der CARMIL2-Defizienz. Damit verdeutlichten unsere Studien die essentielle Rolle von CARMIL2-vermittelten adaptiven Immunzellfunktionen in der Pathogenese von intestinalen Entzündungsreaktionen. Darüber hinaus illustrierte unsere Studie, dass eine frühzeitige Diagnose von

zugrundeliegenden primären Immundefekterkrankungen eine große Bedeutung für die Behandlung und Prognose von Patienten mit therapierefraktären frühkindlichen CED aufweist.

3.8 NOX1-abhängige Regulation der Zellmigration von intestinalen Epithelzellen im Rahmen der Wundheilung – Einblicke von Patienten mit einer Loss-of-Function-Mutation im NOX1-Gen

Khoshnevisan R, Anderson M, Babcock S, Anderson S, Illig D, Marquardt B, Sherkat R, Schröder K, Moll F, Hollizeck S, Rohlf M, Walz C, Adibi P, Rezaei A, Andalib A, Koletzko S, Muise AM, Snapper SB, Klein C, Thiagarajah JR*[#], **Kotlarz D***[#] (2020). Human NOX1 deficiency is associated with altered collective and planktonic cell migration - Insights from Patients with Pediatric-Onset IBD. *Inflamm Bowel Dis* 26, 1166-1176. IF: 4.3. (* equal contribution, [#] corresponding author)

Die intestinale Darmschleimhaut übernimmt als physikalische Barriere eine zentrale Funktion in der Kontrolle von mukosaler Inflammation und Wirtsimmunabwehr gegenüber Pathogenen. Hierbei spielen die Redox-regulierten Signalwege und Zellkommunikationen der intestinalen Barriere eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED (Circu and Aw, *Semin Cell Dev Biol* 2012). Während eine überschießende Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) zu Gewebeschädigungen führt, sind physiologische Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffverbindungen zur Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion von entscheidender Bedeutung (Cordeiro and Jacinto, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; van der Vliet and Janssen-Heininger, *J Cell Biochem* 2014).

Der Nicotinamidenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase 1-Multienzymkomplex stellt die Hauptquelle von ROS in Kolonepithelzellen dar und besteht aus fünf Untereinheiten, wobei NOX1 die katalytische Untereinheit bildet, membrangebundenes p22-PHOX NOX1 stabilisiert und die zytosolischen Untereinheiten NOXA1, NOXO1, und Rac1-GTP die Aktivität von NOX1 regulieren (Bedard and Krause, *Physiol Rev* 2007). Dementsprechend haben Mausstudien demonstriert, dass ein Knockout von *Nox1* in einer gestörten Produktion von ROS in Kolonkrypten resultiert und dadurch die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Darmepithelzellen negativ beeinflusst wird. Beispielsweise führte ein doppelter Knockout von *Nox1* und *I110* im Mausmodell zu vermehrten endoplasmatischen Stressreaktionen in Becherzellen und zu einem mit Colitis ulcerosa vergleichbaren Phänotyp (Tretton et al., *PLoS One* 2014). Die Relevanz von NOX1 in der Kontrolle der humanen epithelialen ROS-Produktion konnte durch die Identifizierung von Patienten mit frühkindlicher CED und *Missense*-Mutationen im *NOX1*-Gen demonstriert werden (Hayes et al., *Cell Mol*

Gastroenterol Hepatol 2015; Schwerd et al., *Mucosal Immunol* 2018). Jedoch bleiben die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weiterhin ungeklärt, wie eine verminderte NOX1-abhängige ROS-Produktion die epitheliale Homöostase beeinträchtigt.

Unsere Studien an einem Indexpatienten mit einer seltenen *stop gain*-Mutation im *NOX1*-Gen und einem kompletten Funktionsverlust des Proteins bestätigten, dass humanes NOX1 ein kritischer Mediator der intestinalen ROS-Produktion ist, und lieferten potentielle neue mechanistische Einblicke in die humane NOX1-Defizienz. So konnten wir unter Verwendung von Paraffin-eingebetteten Gewebeproben des Patienten und heterologen COS7-Zellen mit lentiviral-vermittelter Überexpression der NOX1-Mutante zeigen, dass der Verlust der NOX1-abhängigen ROS-Produktion mit Alterationen der epithelialen Zellmigration, Wundheilung und Zytoskelettfunktionen einhergeht. Insbesondere konnten wir unter Verwendung von hochauflösender Immunfluoreszenzmikroskopie darlegen, dass die NOX1-Defizienz zu einer gestörten Einzelzellmigration mit beeinträchtigter Direktionalität und Zell-Zellinteraktion führt.

Obwohl der Kausalzusammenhang einer NOX1-Defizienz in der Pathogenese der frühkindlichen CED weiterhin kontrovers diskutiert wird und genetische Varianten von *NOX1* eher Risikofaktoren für eine CED darstellen, lieferte unsere Studie an einer seltenen NOX1-Mutation neue Einblicke, dass die NOX1-abhängige ROS-Produktion die Dynamik des Zytoskeletts und die Zellmigration von intestinalen Epithelzellen kontrolliert.

3.9 Humanisierte Mausmodelle als innovative präklinische Krankheitsmodelle für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen – Evaluation einer niedrigdosierten Interleukin-2-Therapie für Patienten mit Colitis ulcerosa

Goettel JA*, **Kotlarz D***, Canavan JB, Konnikova L, Illig D, Frei SM, Emani R, Field M, Gringauz J, Wall SM, Griffith AE, Friedman JR, Towne JE, Plevy SE, Hall AOH, Snapper SB (2019). Low-Dose Interleukin-2 Ameliorates Colitis in a Preclinical Humanized Mouse Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 8, 193-195. IF: 7,1. (* equal contribution)

Bei CED handelt es sich um multifaktorielle und komplexe Erkrankungen. Funktionelle Studien sind aufgrund des beschränkten Zugangs zu Patientenmaterial limitiert. Daher sind Tiermodelle unentbehrlich, um die immunologischen Krankheitsmechanismen in einem Gesamtorganismus zu untersuchen. Konventionelle Knockout-Mausmodelle weisen inhärente Limitationen auf und die therapeutischen Forschungserkenntnisse lassen sich meist nur unzureichend auf Menschen extrapolieren. Durch humane hämatopoetische Stammzellen oder PBMZ rekonstituierte humanisierte Mausmodelle stellen ein geeignetes Modell für die angewandte, biomedizinische Forschung dar.

Im Rahmen unserer Studie haben wir ein humanisiertes Mausmodell der Colitis verwendet, um die therapeutische Effizienz einer niedrigdosierten IL-2-Therapie (*engl.*, low-dose IL-2 therapy) für Patienten mit Colitis ulcerosa präklinisch zu evaluieren. Vorangegangene Studien haben demonstriert, dass Dysfunktionen von Treg-Zellen in einer schweren Autoinflammation und Enteropathie resultieren (Bennett et al., *Nat Genet* 2001; Brunkow et al., *Nat Genet* 2001; Wildin et al., *Nat Genet* 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein adoptiver Transfer von Treg-Zellen im Colitis-Mausmodell eine therapeutische Wirksamkeit hatte (Mottet et al., *J Immunol* 2003) und die klinische Anwendung bei Patienten mit Morbus Crohn bereits erste vielversprechende Ergebnisse lieferte (Desreumaux et al., *Gastroenterology* 2012). Da IL-2 ein Schlüsselfaktor in der Regulierung der Differenzierung und Funktion von Treg-Zellen darstellt, sind bereits zuvor niedrigdosierte IL-2-Therapien zur Behandlung der chronischen Graft-versus-Host Disease, der Hepatitis C-induzierten Vaskulitis, des systemischen Lupus Erythematoses und des Wiskott-Aldrich-Syndroms angewandt worden (He et al., *Nat Med* 2016; Jyonouchi et al., *Clin Immunol* 2017; Koreth et al., *N Engl J Med* 2011; Saadoun et al., *N Engl J Med* 2011).

In einem ersten Versuchsansatz konnten wir zeigen, dass eine niedrigdosierte IL-2-Therapie zur selektiven Expansion und Aktivierung von humanen Treg-Zellen führt, während konventionelle T-Zellen keine erhöhte Phosphorylierung von STAT5 aufwiesen. In einem 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-induzierten Colitis-Modell zeigten IL-2-behandelte Mäuse einen reduzierten Gewichtsverlust und eine geringgradigere histologisch nachweisbare intestinale Gewebeschädigung. Interessanterweise war die reduzierte Krankheitsaktivität in IL-2-behandelten Mäusen zwar mit einer Expansion von peripheren Treg-Zellen assoziiert, jedoch konnten keine Unterschiede in der Frequenz von intestinalen Treg-Zellen zu PBS-behandelten Kontrolltieren beobachtet werden. Weiterführende CyTOF-Analysen von peripheren CD25⁺-Zellen verdeutlichten, dass die niedrigdosierte IL-2-Behandlung insbesondere zur Expansion von CD45RO⁺FOXP3⁺ Treg-Zellen führt. Diese Treg-Zellpopulation zeigte eine erhöhte Expression von Molekülen (HLA-DR, CD45RO, CTLA4) bzw. Chemokinen (CCR4, CCR6), welche für die Aktivierung, Migration und Funktion von Treg-Zellen entscheidend sind.

Zusammenfassend hat unsere Studie verdeutlicht, dass eine niedrigdosierte IL-2-Therapie Treg-Zellen selektiv expandiert und eine experimentelle Colitis in humanisierten Mausmodellen vermindert. Obwohl die detaillierten Mechanismen noch ungeklärt sind, haben unsere vielversprechenden Studien die Basis für die Durchführung einer klinischen Studie der Phase 1b/2a bei Patienten mit moderater bis schwerer Colitis ulcerosa geliefert und die Expansion von peripheren CD45RO⁺FOXP3⁺ Treg-Zellen als potentiellen Prädiktor für ein klinisches Ansprechen aufgezeigt.

4 Status Quo und Ausblick

Patienten mit frühkindlichen CED zeigen häufig einen schweren, therapierefraktären Krankheitsverlauf. Ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen ist zur Optimierung der Behandlung dieser Kinder essentiell. Grundsätzlich weisen CED eine multifaktorielle Pathogenese auf, wobei Umwelteinflüsse, Dysbalancen des Mikrobioms, Defekte der intestinalen Epithelbarriere und Dysfunktionen des Immunsystems in genetisch prädisponierten Kindern zur Erkrankung führen können. Die Erstbeschreibung von Patienten mit IL-10R-Defizienzen hat demonstriert, dass monogenetische Defekte in direkter Kausalität frühkindliche CED verursachen können (Glocker et al., *N Engl J Med* 2009). Diese Studien haben zu einem Paradigmenwechsel in der klinischen Versorgung der frühkindlichen CED geführt, da die Aufklärung der molekularen Krankheitsmechanismen eine direkte therapeutische Relevanz für IL-10R-defiziente Kinder hatte. Dieses hervorragende Beispiel translationaler Forschung hat verdeutlicht, dass die Aufklärung der molekularen Krankheitsmechanismen die Anwendung von personalisierten Therapien (Kotlarz et al., *Gastroenterology* 2012) und eine verbesserte Abschätzungen von krankheitsspezifischen Komplikationen (z. B. Lymphome bei IL-10R-defizienten Patienten) (Neven et al., *Blood* 2013) ermöglicht.

Um weitere genetische Signaturen der frühkindlichen CED aufzuklären, hat unsere Arbeitsgruppe im Rahmen des internationalen und interdisziplinären *VEO-IBD Consortium* mittlerweile eine der größten internationalen Kohorten an Patienten mit frühkindlichen CED unter Verwendung von innovativen Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren analysiert. Im Rahmen dieses genetischen Screenings konnten wir bei ca. 22 % der Patienten Mutationen in bekannten Kandidatengenen für primäre Immundefekte, autoinflammatorische Erkrankungen und intestinale Epitheldefekte nachweisen. Darüber hinaus haben wir TGFB1- (Kotlarz et al., *Nat Genet* 2018), CASP8- (Lehle et al., *Gastroenterology* 2019) und RIPK1- (Li et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2019) Defizienzen als neue monogenetische Krankheitsursachen der frühkindlichen CED identifizieren können. Insgesamt konnte unser genetisches Screening bisher mehr als 44 unterschiedliche Entitäten als Ursache für die frühkindliche CED nachweisen, was verdeutlicht, dass die frühkindliche CED ein heterogenes Krankheitsspektrum darstellt. Da es sich bei den identifizierten genetischen Defekten vornehmlich um primäre Immundefizienzen handelte, konnten unsere Studien für zahlreiche Kinder optimierte und sogar kurative Therapien (HSZT) aufzeigen. Dementsprechend gewinnen genetische Untersuchungen zunehmend Relevanz in der klinischen

Routinediagnostik bei Patienten mit frühkindlicher CED, da dadurch frühzeitigere und spezifischere therapeutische Interventionen ermöglicht werden.

Unsere Forschungsarbeiten haben bereits wichtige Einblicke in die Krankheitsentstehung von frühkindlichen CED geliefert, jedoch sind die zugrundeliegenden molekularen Krankheitsmechanismen noch nicht ausreichend erforscht, um häufig zielgerichtete Therapien abzuleiten. Darüber hinaus sind bei 78 % der Patienten die molekularen Krankheitsursachen weiterhin völlig unklar. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit zur Anwendung innovativer Analyseverfahren in der translationalen Erforschung von frühkindlichen CED. Die Komplementierung von genomischen Daten durch weitere systembiologische Hochdurchsatzverfahren, sogenannte Omics-Technologien, stellt einen vielversprechenden zukünftigen Forschungsansatz dar. Die Anwendung von Multi-Omics-Verfahren kann neben der Gensequenz (Genomics) umfassende qualitative und quantitative Daten von epigenetischen Modifikationen (Epigenomics), Genexpressionsprofilen (Transcriptomics), Proteinen (Proteomics), Stoffwechselprodukten (Metabolomics) und Mikrobiomen (Microbiomics) einzelner komplexer Gewebeproben generieren. Unter Anwendung von computerbasierten Verfahren, die Künstliche Intelligenz und Algorithmen für maschinelles Lernen umfassen, werden diese hochdimensionalen Daten (Big Data) entscheidende Erkenntnisse über komplexe Krankheitsmechanismen auf molekularer Ebene liefern. Dieses Wissen bildet die Grundlage zur Entwicklung neuer maßgeschneiderter Präventions-, Diagnostik- und Behandlungsverfahren mit verbesserter Wirksamkeit und reduziertem Nebenwirkungsprofil. Darüber hinaus liefern monogenetische Defekte als Modellerkrankung Einblicke in grundlegende physiologische Funktionen von Schlüsselmolekülen und pathogenetisch relevanten Signalwegen. Das Ziel zukünftiger Forschungsaktivitäten wird es sein, in Pionierarbeit einen Atlas von genetischen und immunologischen Signaturen der frühkindlichen CED zu generieren, um die Routinediagnostik und Therapien für Kinder mit lebensbedrohlichen Erkrankungen zu optimieren.

Um zudem die molekularen Pathomechanismen und Biomarker monogenetischer Defekte funktionell zu erforschen, werden neben der Anwendung von Multi-Omics-Technologien innovative Krankheitsmodelle benötigt. Daher hat meine Arbeitsgruppe eine umfassende experimentelle Plattform etabliert, um zukünftig Krankheitsursachen an verschiedenen primären Patientenproben, heterologen genetisch-modifizierten Modellen (lentiviraler Gentransfer, CRISPR/Cas9-vermittelte Genom-Editierung), induzierten pluripotenten Stammzellen, intestinalen Organoiden (3D Mini-Därme) und humanisierten Mausmodellen zu erforschen. Wir postulieren, dass diese weiterführenden Studien zukünftig als Katalysator zur

Entwicklung innovativer Diagnoseverfahren und personalisierter Therapiestrategien für Kinder mit CED dienen, aber auch das Potential haben, neue Therapieprinzipien für häufige inflammatorische oder immunologische Erkrankungen aufzuzeigen.

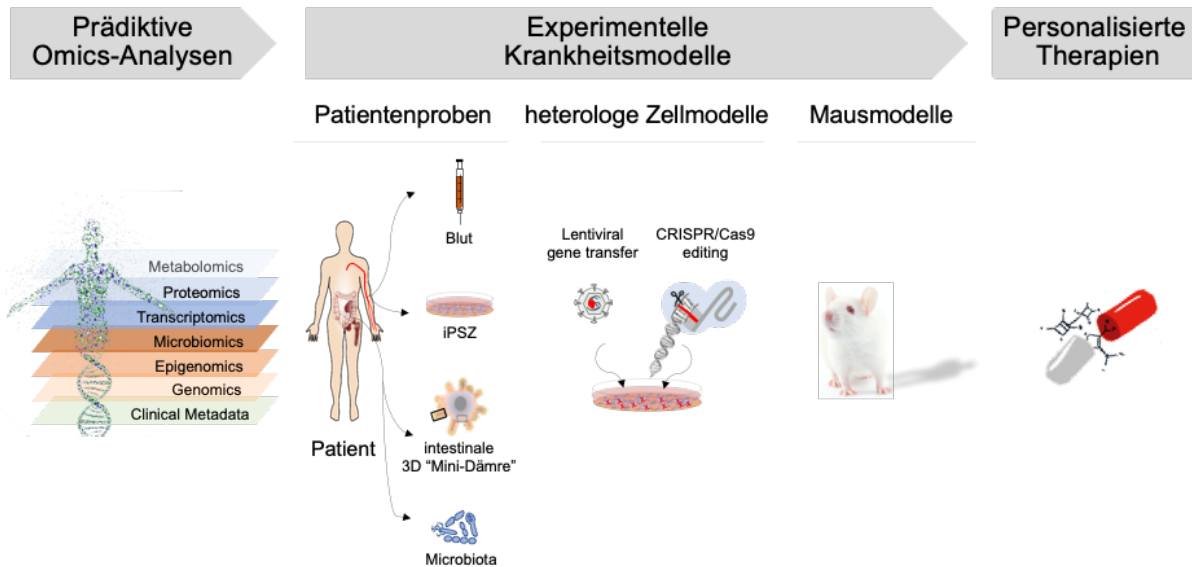


Abbildung 2. Von der Erforschung molekularer Krankheitsmechanismen zur Entwicklung personalisierter Therapien für Patienten mit frühkindlichen CED – ein systembiologischer Ansatz.

Die Komplementierung von genomischen Daten durch weitere systembiologische Hochdurchsatzverfahren, sogenannte Omics-Technologien, stellt einen vielversprechenden zukünftigen Forschungsansatz dar, um die molekularen Krankheitsursachen der frühkindlichen CED zu erforschen. Um zudem die molekularen Pathomechanismen und Biomarker monogenetischer Defekte funktionell zu erforschen, werden neben der Anwendung von Multi-Omics-Technologien innovative Krankheitsmodelle benötigt: primären Patientenproben, heterologe genetisch-modifizierte Modelle (lentiviraler Gentransfer, CRISPR/Cas9-vermittelte Genom-Editierung), induzierte pluripotente Stammzellen, intestinale Organoiden (3D Mini-Därme) und humanisierte Mausmodelle.

5 Literaturverzeichnis

- Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, Vavricka SR, and Fiocchi C (2018). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 39-49.
- Becker C, Watson AJ, and Neurath MF (2013). Complex roles of caspases in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 144, 283-293.
- Bedard K, and Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313.
- Ben Moshe T, Barash H, Kang TB, Kim JC, Kovalenko A, Gross E, Schuchmann M, Abramovitch R, Galun E, and Wallach D (2007). Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice. *Hepatology* 45, 1014-1024.
- Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, and Griffiths AM (2011). Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis* 17, 423-439.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, and Ochs HD (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21.
- Blobe GC, Schiemann WP, and Lodish HF (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342, 1350-1358.
- Brant SR (2011). Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis* 17, 1-5.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, and Ramsdell F (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.
- Buderus S, Scholz D, Behrens R, Classen M, De Laffolie J, Keller KM, Zimmer KP, Koletzko S, and Group C-GS (2015). Inflammatory bowel disease in pediatric patients: Characteristics of newly diagnosed patients from the CEDATA-GPGE Registry. *Dtsch Arztebl Int* 112, 121-127.
- Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, and Lenardo MJ (2002). Pleiotropic defects

- in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419, 395-399.
- Circu ML, and Aw TY (2012). Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol* 23, 729-737.
- Collaborators GBDIBD (2020). The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5, 17-30.
- Cordeiro JV, and Jacinto A (2013). The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 249-262.
- Cuchet-Lourenco D, Eletto D, Wu C, Plagnol V, Papapietro O, Curtis J, Ceron-Gutierrez L, Bacon CM, Hackett S, Alsaleem B, Maes M, Gaspar M, Alisaac A, Goss E, Alldrissi E, Siegmund D, Wajant H, Kumararatne D, AlZahrani MS, Arkwright PD, Abinun M, Doffinger R, and Nejentsev S (2018). Biallelic RIPK1 mutations in humans cause severe immunodeficiency, arthritis, and intestinal inflammation. *Science* 361, 810-813.
- de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, Lamb CA, Luo Y, Kennedy NA, Jostins L, Rice DL, Gutierrez-Achury J, Ji SG, Heap G, Nimmo ER, Edwards C, Henderson P, Mowat C, Sanderson J, Satsangi J, Simmons A, Wilson DC, Tremelling M, Hart A, Mathew CG, Newman WG, Parkes M, Lees CW, Uhlig H, Hawkey C, Prescott NJ, Ahmad T, Mansfield JC, Anderson CA, and Barrett JC (2017). Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 49, 256-261.
- Desreumaux P, Foussat A, Allez M, Beaugerie L, Hebuterne X, Bouhnik Y, Nachury M, Brun V, Bastian H, Belmonte N, Ticchioni M, Duchange A, Morel-Mandrino P, Neveu V, Clerget-Chossat N, Forte M, and Colombel JF (2012). Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 143, 1207-1217.
- Edwards M, Zwolak A, Schafer DA, Sept D, Dominguez R, and Cooper JA (2014). Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 677-689.
- Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky

- M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, Van Gossum A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panes J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhart AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ, and Parkes M (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42, 1118-1125.
- Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, and Klein C (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361, 2033-2045.
- Gower-Rousseau C, Dauchet L, Vernier-Massouille G, Tilloy E, Brazier F, Merle V, Dupas JL, Savoye G, Balde M, Marti R, Lerebours E, Cortot A, Salomez JL, Turck D, and Colombel JF (2009). The natural history of pediatric ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 104, 2080-2088.
- Gunther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, Waldner MJ, Hedrick SM, Tenzer S, Neurath MF, and Becker C (2011). Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature* 477, 335-339.
- Harris PA, Berger SB, Jeong JU, Nagilla R, Bandyopadhyay D, Campobasso N, Capriotti CA, Cox JA, Dare L, Dong X, Eidam PM, Finger JN, Hoffman SJ, Kang J, Kasparcova V, King BW, Lehr R, Lan Y, Leister LK, Lich JD, MacDonald TT, Miller NA, Ouellette MT, Pao CS, Rahman A, Reilly MA, Rendina AR, Rivera EJ, Schaeffer MC, Schon CA, Singhaus RR, Sun HH, Swift BA, Totoritis RD, Vossenkamper A, Ward P, Wisnoski DD, Zhang D, Marquis RW, Gough PJ, and Bertin J (2017). Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) Kinase Specific Clinical Candidate (GSK2982772) for the Treatment of Inflammatory Diseases. *J Med Chem* 60, 1247-1261.
- Hayes P, Dhillon S, O'Neill K, Thoeni C, Hui KY, Elkadri A, Guo CH, Kovacic L, Aviello G, Alvarez LA, Griffiths AM, Snapper SB, Brant SR, Doroshov JH, Silverberg MS, Peter I, McGovern DP, Cho J, Brumell JH, Uhlig HH, Bourke B, Muise AA, and Knaus UG (2015). Defects in NADPH Oxidase Genes NOX1 and DUOX2 in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1, 489-502.

- He J, Zhang X, Wei Y, Sun X, Chen Y, Deng J, Jin Y, Gan Y, Hu X, Jia R, Xu C, Hou Z, Leong YA, Zhu L, Feng J, An Y, Jia Y, Li C, Liu X, Ye H, Ren L, Li R, Yao H, Li Y, Chen S, Zhang X, Su Y, Guo J, Shen N, Morand EF, Yu D, and Li Z (2016). Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 22, 991-993.
- Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, and Schulzke JD (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129, 550-564.
- Huang H, Fang M, Jostins L, Umicevic Mirkov M, Boucher G, Anderson CA, Andersen V, Cleyne I, Cortes A, Crins F, D'Amato M, Deffontaine V, Dmitrieva J, Docampo E, Elansary M, Farh KK, Franke A, Gori AS, Goyette P, Halfvarson J, Haritunians T, Knight J, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mariman R, Meuwissen T, Mni M, Momozawa Y, Parkes M, Spain SL, Theatre E, Trynka G, Satsangi J, van Sommeren S, Vermeire S, Xavier RJ, International Inflammatory Bowel Disease Genetics C, Weersma RK, Duerr RH, Mathew CG, Rioux JD, McGovern DPB, Cho JH, Georges M, Daly MJ, and Barrett JC (2017). Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature* 547, 173-178.
- Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, Russell RK, Annese V, Dubinsky M, Kugathasan S, Bradfield JP, Walters TD, Sleiman P, Kim CE, Muise A, Wang K, Glessner JT, Saeed S, Zhang H, Frackelton EC, Hou C, Flory JH, Otieno G, Chiavacci RM, Grundmeier R, Castro M, Latiano A, Dallapiccola B, Stempak J, Abrams DJ, Taylor K, McGovern D, Western Regional Alliance for Pediatric IBD, Silber G, Wrobel I, Quiros A, International IBDGC, Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmuda MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ, Consortium NIG, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Belgian-French IBDC, Wellcome Trust Case Control C, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwillam R, Tremelling M, Delukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ, Heyman MB, Ferry GD, Kirschner B, Lee J, Essers J, Grand R, Stephens M, Levine A, Piccoli D, Van Limbergen J, Cucchiara S, Monos DS, Guthery SL, Denson L, Wilson DC,

- Grant SF, Daly M, Silverberg MS, Satsangi J, and Hakonarson H (2009). Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 41, 1335-1340.
- Janssens K, Vanhoenacker F, Bonduelle M, Verbruggen L, Van Maldergem L, Ralston S, Guanabens N, Migone N, Wientroub S, Divizia MT, Bergmann C, Bennett C, Simsek S, Melancon S, Cundy T, and Van Hul W (2006). Camurati-Engelmann disease: review of the clinical, radiological, and molecular data of 24 families and implications for diagnosis and treatment. *J Med Genet* 43, 1-11.
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Buning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JJ, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H, International IBDGC, Silverberg MS, Annesse V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, and Cho JH (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119-124.
- Jyonouchi S, Gwafila B, Gwalani LA, Ahmad M, Moertel C, Holbert C, Kim JY, Kobrinsky N, Roy-Ghanta S, and Orange JS (2017). Phase I trial of low-dose interleukin 2 therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol* 179, 47-53.
- Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, Armand P, Cutler C, Ho VT, Treister NS, Bienfang DC, Prasad S, Tzachanis D, Joyce RM, Avigan DE, Antin JH, Ritz J, and Soiffer RJ (2011). Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 365, 2055-2066.
- Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, Pfeifer D, Kreipe H, Pfister ED, Baumann U, Puchalka J, Bohne J, Egritas O, Dalgic B, Kolho KL, Sauerbrey A,

- Buderus S, Gungor T, Enninger A, Koda YK, Guariso G, Weiss B, Corbacioglu S, Socha P, Uslu N, Metin A, Wahbeh GT, Husain K, Ramadan D, Al-Herz W, Grimbacher B, Sauer M, Sykora KW, Koletzko S, and Klein C (2012). Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 143, 347-355.
- Kotlarz D, Zietara N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, Krawitz PM, Robinson PN, Hecht J, Puchalka J, Gertz EM, Schaffer AA, Lawrence MG, Kardava L, Pfeifer D, Baumann U, Pfister ED, Hanson EP, Schambach A, Jacobs R, Kreipe H, Moir S, Milner JD, Schwille P, Mundlos S, and Klein C (2013). Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* 210, 433-443.
- Kovalenko A, Kim JC, Kang TB, Rajput A, Bogdanov K, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Brenner O, and Wallach D (2009). Caspase-8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin disease. *J Exp Med* 206, 2161-2177.
- Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PM, Imielinski M, Guthery SL, Cucchiara S, Kim CE, Frackelton EC, Annaiah K, Glessner JT, Santa E, Willson T, Eckert AW, Bonkowski E, Shaner JL, Smith RM, Otieno FG, Peterson N, Abrams DJ, Chiavacci RM, Grundmeier R, Mamula P, Tomer G, Piccoli DA, Monos DS, Annese V, Denson LA, Grant SF, and Hakonarson H (2008). Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 40, 1211-1215.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, and Muller W (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.
- LaPorte SL, Joo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, Keegan AD, and Garcia KC (2008). Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* 132, 259-272.
- Liang Y, Cucchetti M, Roncagalli R, Yokosuka T, Malzac A, Bertosio E, Imbert J, Nijman IJ, Suchanek M, Saito T, Wulfig C, Malissen B, and Malissen M (2013). The lymphoid lineage-specific actin-uncapping protein Rltpr is essential for costimulation via CD28 and the development of regulatory T cells. *Nat Immunol* 14, 858-866.
- Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, Ripke S, Lee JC, Jostins L, Shah T, Abedian S, Cheon JH, Cho J, Dayani NE, Franke L, Fuyuno Y, Hart A, Juyal RC, Juyal G, Kim WH, Morris AP, Poustchi H, Newman WG, Midha V, Orchard TR, Vahedi H, Sood A, Sung JY, Malekzadeh R, Westra HJ, Yamazaki K, Yang SK, International Multiple Sclerosis Genetics C, International IBDGC, Barrett JC, Alizadeh BZ, Parkes M, Bk T, Daly MJ, Kubo M, Anderson CA, and Weersma RK (2015). Association

- analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 47, 979-986.
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, and Dietz HC (2005). A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 37, 275-281.
- Lowe AM, Roy PO, M BP, Michel P, Bitton A, St-Onge L, and Brassard P (2009). Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. *Inflamm Bowel Dis* 15, 429-435.
- Miot C, Imai K, Imai C, Mancini AJ, Kucuk ZY, Kawai T, Nishikomori R, Ito E, Pellier I, Dupuis Girod S, Rosain J, Sasaki S, Chandrakasan S, Pachlopnik Schmid J, Okano T, Colin E, Olaya-Vargas A, Yamazaki-Nakashimada M, Qasim W, Espinosa Padilla S, Jones A, Krol A, Cole N, Jolles S, Bleesing J, Vraetz T, Gennery AR, Abinun M, Gungor T, Costa-Carvalho B, Condino-Neto A, Veys P, Holland SM, Uzel G, Moshous D, Neven B, Blanche S, Ehl S, Doffinger R, Patel SY, Puel A, Bustamante J, Gelfand EW, Casanova JL, Orange JS, and Picard C (2017). Hematopoietic stem cell transplantation in 29 patients hemizygous for hypomorphic IKBKG/NEMO mutations. *Blood* 130, 1456-1467.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, and Kaplan GG (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46-54.
- Mottet C, Uhlig HH, and Powrie F (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 170, 3939-3943.
- Mullard A (2018). Microglia-targeted candidates push the Alzheimer drug envelope. *Nat Rev Drug Discov* 17, 303-305.
- Murugan D, Albert MH, Langemeier J, Bohne J, Puchalka J, Jarvinen PM, Hauck F, Klenk AK, Prell C, Schatz S, Diestelhorst J, Sciskala B, Kohistani N, Belohradsky BH, Muller S, Kirchner T, Walter MR, Bufler P, Muise AM, Snapper SB, Koletzko S, Klein C, and Kotlarz D (2014). Very early onset inflammatory bowel disease associated with aberrant trafficking of IL-10R1 and cure by T cell replete haploidentical bone marrow transplantation. *J Clin Immunol* 34, 331-339.
- Neurath MF (2017). Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 269-278.
- Neurath MF (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 14, 329-342.

- Neurath MF (2020). Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 76-77.
- Neurath MF (2019). Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nat Immunol* 20, 970-979.
- Neven B, Mamessier E, Bruneau J, Kaltenbach S, Kotlarz D, Suarez F, Masliah-Planchon J, Billot K, Canioni D, Frange P, Radford-Weiss I, Asnafi V, Murugan D, Bole C, Nitschke P, Goulet O, Casanova JL, Blanche S, Picard C, Hermine O, Rieux-Laucat F, Brousse N, Davi F, Baud V, Klein C, Nadel B, Ruemmele F, and Fischer A (2013). A Mendelian predisposition to B-cell lymphoma caused by IL-10R deficiency. *Blood* 122, 3713-3722.
- Nikolaus S, and Schreiber S (2007). Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 133, 1670-1689.
- Oberst A, and Green DR (2011). It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 757-763.
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, and Binder V (1991). Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324, 84-88.
- Podolsky DK (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347, 417-429.
- Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, Candotti F, Isakov J, Whitwam T, Conley ME, Fischer RE, Rosenblatt HM, Small TN, and Buckley RH (1997). Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 89, 1968-1977.
- Rickert M, Wang X, Boulanger MJ, Goriatcheva N, and Garcia KC (2005). The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science* 308, 1477-1480.
- Ring AM, Lin JX, Feng D, Mitra S, Rickert M, Bowman GR, Pande VS, Li P, Moraga I, Spolski R, Ozkan E, Leonard WJ, and Garcia KC (2012). Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol* 13, 1187-1195.
- Rochman Y, Spolski R, and Leonard WJ (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 9, 480-490.
- Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL, Griffiths A, Levine A, Escher JC, Amil Dias J, Barabino A, Braegger CP, Bronsky J, Buderus S, Martin-de-Carpi J, De Ridder L, Fagerberg UL, Hugot JP, Kierkus J, Kolacek S, Koletzko S, Lionetti P, Miele E, Navas Lopez VM, Paerregaard A, Russell RK, Serban DE, Shaoul R, Van Rheenen P, Veereman G, Weiss B, Wilson D, Dignass A, Eliakim A, Winter H, Turner D, European Cs, Colitis O, European Society of Pediatric Gastroenterology H, and Nutrition (2014). Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 8, 1179-1207.

- Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, Sene D, Cacoub P, and Klatzmann D (2011). Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 365, 2067-2077.
- Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, and Geginat J (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 331-344.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, and Hafler DA (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 490-500.
- Schober T, Magg T, Laschinger M, Rohlf M, Linhares ND, Puchalka J, Weisser T, Fehlner K, Mautner J, Walz C, Hussein K, Jaeger G, Kammer B, Schmid I, Bahia M, Pena SD, Behrends U, Belohradsky BH, Klein C, and Hauck F (2017). A human immunodeficiency syndrome caused by mutations in CARMIL2. *Nat Commun* 8, 14209.
- Schwerd T, Bryant RV, Pandey S, Capitani M, Meran L, Cazier JB, Jung J, Mondal K, Parkes M, Mathew CG, Fiedler K, McCarthy DJ, Consortium WGS, Oxford IBDcsi, investigators CiIg, Consortium UIG, Sullivan PB, Rodrigues A, Travis SPL, Moore C, Sambrook J, Ouwehand WH, Roberts DJ, Danesh J, Study I, Russell RK, Wilson DC, Kelsen JR, Cornell R, Denson LA, Kugathasan S, Knaus UG, Serra EG, Anderson CA, Duerr RH, McGovern DP, Cho J, Powrie F, Li VS, Muise AM, and Uhlig HH (2018). NOX1 loss-of-function genetic variants in patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 11, 562-574.
- Sun M, He C, Cong Y, and Liu Z (2015). Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunol* 8, 969-978.
- Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, and Fox DA (2008). Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223, 87-113.
- Treton X, Pedruzzi E, Guichard C, Ladeiro Y, Sedghi S, Vallee M, Fernandez N, Bruyere E, Woerther PL, Ducroc R, Montcuquet N, Freund JN, Van Seuning I, Barreau F, Marah A, Hugot JP, Cazals-Hatem D, Bouhnik Y, Daniel F, and Ogier-Denis E (2014). Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic reticulum stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice. *PLoS One* 9, e101669.
- Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, Dias JA, Bronsky J, Braegger CP, Cucchiara S, de Ridder L, Fagerberg UL, Hussey S, Hugot JP, Kolacek S, Kolho KL, Lionetti P, Paerregaard A, Potapov A, Rintala R, Serban DE, Staiano A, Sweeny B, Veerman G, Veres G, Wilson DC, Ruemmele FM, European Cs, Colitis O, European Society for Paediatric Gastroenterology H, and Nutrition (2012). Management of pediatric

- ulcerative colitis: joint ECCO and ESPGHAN evidence-based consensus guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55, 340-361.
- Turner D, Walsh CM, Benchimol EI, Mann EH, Thomas KE, Chow C, McLernon RA, Walters TD, Swales J, Steinhardt AH, and Griffiths AM (2008). Severe paediatric ulcerative colitis: incidence, outcomes and optimal timing for second-line therapy. *Gut* 57, 331-338.
- Uhlig HH (2013). Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 1795-1805.
- van der Vliet A, and Janssen-Heininger YM (2014). Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem* 115, 427-435.
- Van Limbergen J, Russell RK, Drummond HE, Aldhous MC, Round NK, Nimmo ER, Smith L, Gillett PM, McGrogan P, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Arnott ID, Satsangi J, and Wilson DC (2008). Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 135, 1114-1122.
- Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, and Rogler G (2015). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 21, 1982-1992.
- Vernier-Massouille G, Balde M, Salleron J, Turck D, Dupas JL, Mouterde O, Merle V, Salomez JL, Branche J, Marti R, Lerebours E, Cortot A, Gower-Rousseau C, and Colombel JF (2008). Natural history of pediatric Crohn's disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 135, 1106-1113.
- Vignali DA, Collison LW, and Workman CJ (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.
- Vitale S, Strisciuglio C, Pisapia L, Miele E, Barba P, Vitale A, Cenni S, Bassi V, Maglio M, Del Pozzo G, Troncone R, Staiano A, and Gianfrani C (2017). Cytokine production profile in intestinal mucosa of paediatric inflammatory bowel disease. *PLoS One* 12, e0182313.
- Wang Y, Ma CS, Ling Y, Bousfiha A, Camcioglu Y, Jacquot S, Payne K, Crestani E, Roncagalli R, Belkadi A, Kerner G, Lorenzo L, Deswarte C, Chrabieh M, Patin E, Vincent QB, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Ailal F, Quintana-Murci L, Fraitag S, Alyanakian MA, Leruez-Ville M, Picard C, Puel A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Malissen M, Malissen B, Abel L, Hovnanian A, Notarangelo LD, Jouanguy E, Tangye SG, Beziat V, and Casanova JL (2016). Dual T cell- and B cell-intrinsic deficiency in humans with biallelic RLTPR mutations. *J Exp Med* 213, 2413-2435.

- Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Prohl S, Appleby M, and Brunkow ME (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27, 18-20.
- Wittig R, Albers L, Koletzko S, Saam J, and von Kries R (2019). Pediatric Chronic Inflammatory Bowel Disease in a German Statutory Health INSURANCE-Incidence Rates From 2009 to 2012. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 68, 244-250.
- Wu MY, and Hill CS (2009). Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell* 16, 329-343.
- Xavier RJ, and Podolsky DK (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434.

6 Abkürzungsverzeichnis

ALPS	Autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom
ATG16L1	Autophagy-related protein 16-1
CARMIL2	Cytosolic capping protein, Arp2/3 and myosin-I linker protein 2
CASP8	Caspase-8
CCR	C-C chemokine receptor type
CD	engl., cluster of differentiation
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CRISPR/Cas9	engl., clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte protein 4
CyTOF	engl., cytometry by time of flight
DLG5	Disks large homolog 5
DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	engl., fluorescence-activated cell sorting
FADD	FAS-associated death domain protein
FOXP3	Forkhead box protein P3
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IL	Interleukin
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein
ITLN1	Intelectin-1
JAK2	Janus kinase 2
LPMZ	Lamina propria mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
LRRK2	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2
MAdCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
MIP-1 α /MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1-alpha/beta
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEMO	NF-kappa-B essential modulator

NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NOD2/CARD15	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2/ Caspase recruitment domain-containing protein 15
NOX1	NADPH oxidase 1
NOXA1	NADPH oxidase activator 1
NOXO1	NADPH oxidase organizer 1
PMBZ	periphere mononukleäre Blutzellen
PTGER4	Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RIPK1/RIPK3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3
ROS	engl., reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
Th	T-Helferzellen
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
SCID	schwere kombinierte Immundefizienz
SMAD2/3	Mothers against decapentaplegic homolog 2/3
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF- β 1	Transforming growth factor-beta 1
TGFBR1/TGFBR2	TGF-beta receptor type-1/-2
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
XBP1	X-box-binding protein 1
z. B.	zum Beispiel

7 Vollständiges Schriftenverzeichnis

7.1 Originalarbeiten als Erst- und Letztautor

* equal contribution, # corresponding author

1. Khoshnevisan R, Anderson M, Babcock S, Anderson S, Illig D, Marquardt B, Sherkat R, Schröder K, Moll F, Hollizeck S, Rohlfs M, Walz C, Adibi P, Rezaei A, Andalib A, Koletzko S, Muise AM, Snapper SB, Klein C, Thiagarajah JR*[#], **Kotlarz D***[#] (2020). Human NOX1 deficiency is associated with altered collective and planktonic cell migration - Insights from Patients with Pediatric-Onset IBD. *Inflamm Bowel Dis* 26, 1166-1176. IF: 4,3.
2. Magg T, Shcherbina A, Arslan D, Desai MM, Wall S, Mitsialis V, Conca R, Unal E, Karacabey N, Mukhina A, Rodina Y, Taur PD, Illig D, Marquardt B, Hollizeck S, Jeske T, Gothe F, Schober T, Rohlfs M, Koletzko S, Lurz E, Muise AM, Snapper SB, Hauck F, Klein C, **Kotlarz D***[#] (2019). CARMIL2 Deficiency Presenting as Very Early Onset Inflamm Bowel Dis 25, 1788-1795. IF: 4,0.
3. Lyszkiewicz M*, **Kotlarz D***, Zietara N*, Brandes G, Diestelhorst J, Glage S, Hobeika E, Reth M, Huber LA, Krueger A, Klein D (2019). LAMTOR2 (p14) controls B cell differentiation by orchestrating endosomal BCR trafficking. *Front Immunol* 10, 497. IF: 4,7.
4. Illig D, Navratil M, Kelečić J, Conca R, Hojsak I, Jadrešin O, Ćorić M, Vuković J, Rohlfs M, Hollizeck S, Bohne J, Klein C*, **Kotlarz D***[#] (2019). Alternative Splicing Rescues Loss of Common Gamma Chain Function and Results in IL-21R-like Deficiency. *J Clin Immunol* 39, 207-215. IF: 6,8.
5. Goettel JA*, **Kotlarz D***, Canavan JB, Konnikova L, Illig D, Frei SM, Emani R, Field M, Gringauz J, Wall SM, Griffith AE, Friedman JR, Towne JE, Plevy SE, Hall AOH, Snapper SB (2019). Low-Dose Interleukin-2 Ameliorates Colitis in a Preclinical Humanized Mouse Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 8, 193-195. IF: 7,1.
6. Li Y, Führer M, Bahrami E, Socha P, Klaudel-Dreszler M, Bouzidi A, Liu Y, Lehle AS, Magg T, Hollizeck S, Rohlfs M, Conca R, Field M, Warner N, Mordechai S, Shteyer E, Turner D, Boukari R, Belbouab R, Walz C, Gaidt M, Hornung V, Baumann B, Pannicke U, Al Idrissi E, Alghamdi HA, Sepulveda F, Gil M, Saint Basile G, Hoenig M, Koletzko S, Muise AM, Snapper SB, Schwarz K*, Klein C*, **Kotlarz D***[#] (2019). Human RIPK1 Deficiency Causes Combined Immunodeficiency and Inflammatory Bowel Diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 970-975. IF: 9,6.
7. Lehle AS, Farin HF, Marquardt B, Michels BE, Magg T, Li Y, Liu Y, Ghalandary M, Lammens K, Hollizeck S, Rohlfs M, Hauck F, Conca R, Walz C, Weiss B, Lev A, Simon AJ, Groß O, Gaidt MM, Hornung V, Clevers H, Yazbeck N, Hanna-Wakim R, Shouval DS, Warner N, Somech R, Muise AM, Snapper SS, Bufler P, Koletzko S, Klein C*, **Kotlarz D***[#] (2019). Intestinal Inflammation and Dysregulated Immunity in Patients with Inherited Caspase-8 Deficiency. *Gastroenterology*, 156, 275-278. IF: 20,9.
8. Somekh I, Marquardt B, Liu Y, Rohlfs M, Karakukcu M, Unal E, Yilmaz E, Patiroglu T, Cansever M, Frizinsky S, Vishnvenska-Dai V, Rechavi E, Stauber T, Simon AJ, Lev A, Klein C, **Kotlarz D***, Somech R* (2018). Novel mutations in RASGRP1 are associated with immunodeficiency, immune dysregulation and EBV-induced lymphoma. *J Clin Immunol* 38, 699-710. IF: 4,1.

9. **Kotlarz D***, Marquardt B*, Barøy T, Lee WS, Konnikova L, Hollizeck S, Magg T, Lehle AS, Walz C, Borggraefe I, Hauck F, Bufler P, Conca R, Wall S, Schumacher EM, Misceo D, Frengen E, Bentsen BS, Uhlig H, Hopfner K-P, Muise AM, Snapper SB, Strømme P, Klein C (2018). Human TGF- β 1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy. *Nature Genetics* 50, 344–348. IF: 27,1.
10. **Kotlarz D**, Egritas Gurkan O, Haskologlu ZS, Ekinci O, Aksu Unlusoy A, Gurcan Kaya N, Puchalka J, Klein C, and Dalgic B (2017). Differential diagnosis in ulcerative colitis in an adolescent: Chronic granulomatous disease needs extra attention. *World J Gastrointest Pathophysiol* 8, 87-92. IF: not available.
11. Murugan D, Albert MH, Langemeier J, Bohne J, Puchalka J, Jarvinen PM, Hauck F, Klenk AK, Prell C, Schatz S, Diestelhorst J, Sciskala B, Kohistani N, Belohradsky BH, Muller S, Kirchner T, Walter MR, Bufler P, Muise AM, Snapper SB, Koletzko S, Klein C, and **Kotlarz D[#]** (2014). Very early onset inflammatory bowel disease associated with aberrant trafficking of IL-10R1 and cure by T cell replete haploidentical bone marrow transplantation. *J Clin Immunol* 34, 331-339. IF: 3,2.
12. **Kotlarz D***, Zietara N*, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, Krawitz PM, Robinson PN, Hecht J, Puchalka J, Gertz EM, Schaffer AA, Lawrence MG, Kardava L, Pfeifer D, Baumann U, Pfister ED, Hanson EP, Schambach A, Jacobs R, Kreipe H, Moir S, Milner JD, Schwille P, Mundlos S, and Klein C (2013). Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* 210, 433-443. IF: 13,9.
13. **Kotlarz D***, Beier R*, Murugan D*, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, Pfeifer D, Kreipe H, Pfister ED, Baumann U, Puchalka J, Bohne J, Egritas O, Dalgic B, Kolho KL, Sauerbrey A, Buderus S, Gungor T, Enninger A, Koda YK, Guariso G, Weiss B, Corbacioglu S, Socha P, Uslu N, Metin A, Wahbeh GT, Husain K, Ramadan D, Al-Herz W, Grimbacher B, Sauer M, Sykora KW, Koletzko S, and Klein C (2012). Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 143, 347-355. IF: 12,8.
14. Glocker EO*, **Kotlarz D***, Boztug K*, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, and Klein C (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361, 2033-2045. IF: 47,1.
15. Templin C*, **Kotlarz D***, Rathinam C, Rudolph C, Schatzlein S, Ramireddy K, Rudolph KL, Schlegelberger B, Klein C, and Drexler H (2008). Establishment of immortalized multipotent hematopoietic progenitor cell lines by retroviral-mediated gene transfer of beta-catenin. *Exp Hematol* 36, 204-215. IF: 3,2.

7.2 Originalarbeiten als Koautor

1. Uhlig HH, Charbit-Henrion F, **Kotlarz D**, Shouval DS, Schwerd T, Strisciuglio C, de Ridder L, van Limbergen J, Macchi M, Snapper SB, Ruemmele FM, Wilson DC, Travis SPL, Griffiths AM, Turner D, Klein C, Muise AM, Russell RK; Paediatric IBD Porto group of ESPGHAN (2021). Clinical Genomics for the Diagnosis of Monogenic Forms of Inflammatory Bowel Disease: A Position Paper From the Paediatric IBD Porto Group of European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 72, 456-473. IF: 2,9.
2. Ye Z, Hu W, Wu B, Zhang Y, Lei C, Williams I, Shouval D, Kanegane H, Kim KM, de Ridder L, Shah N, Ling G, Yerushalmi B, **Kotlarz D**, Snapper S, Horn R, Klein C, Muise A, Huang Y, Uhlig HH (2021). Predictive Prenatal Diagnosis for Infantile-Onset Inflammatory Bowel Disease due to Interleukin-10 Signalling Defects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 72, 276-281. IF: 2,9.
3. Dhingani N, Guo C, Pan J, Li Q, Warner N, Jardine S, Leung G, **Kotlarz D**, Gonzaga-Jauregui C, Klein C, Snapper SB, Navas-López VM, Muise AM (2020). The E3 ubiquitin ligase UBR5 interacts with TTC7A and may be associated with very early onset inflammatory bowel disease. *Sci Rep* 10, 18648. IF: 4,0.
4. Ziv A, Werner L, Konnikova L, Awad A, Jeske T, Hastreiter M, Mitsialis V, Stauber T, Wall S, **Kotlarz D**, Klein C, Snapper SB, Tzfati Y, Weiss B, Somech R, Shouval DS (2020). An RTEL1 Mutation Links to Infantile-Onset Ulcerative Colitis and Severe Immunodeficiency. *J Clin Immunol* 40, 1010-1019. IF: 6,8.
5. Rahmani F, Rayzan E, Rahmani MR, Shahkarami S, Zoghi S, Rezaei A, Aryan Z, Najafi M, Rohlf M, Jeske T, Aflatoonian M, Chavoshzadeh Z, Farahmand F, Motamed F, Rohani P, Alimadadi H, Mahdavian A, Mansouri M, Tavakol M, Vanderberg M, **Kotlarz D**, Klein C, Rezaei N (2020). Clinical and Mutation Description of the First Iranian Cohort of Infantile Inflammatory Bowel Disease: The Iranian Primary Immunodeficiency Registry (IPIDR). *Immunol Invest*, Jul 7:1-15. IF: 2,7.
6. Crowley E, Warner N, Pan J, Khalouei S, Elkadri A, Fiedler K, Foong J, Turinsky AL, Bronte-Tinkew D, Zhang S, Hu J, Tian D, Li D; Regeneron Genetics Center, Horowitz J, Siddiqui I, Upton J, Roifman CM, Church PC, Wall DA, Ramani AK, **Kotlarz D**, Klein C, Uhlig H, Snapper SB, Gonzaga-Jauregui C, Paterson A, McGovern DP, Brudno M, Walters TD, Griffiths AM, Muise AM (2020). Prevalence and Clinical Features of Inflammatory Bowel Diseases Associated with Monogenic Variants, Identified by Whole-exome Sequencing in 1000 Children at a Single Center. *Gastroenterology* 158, 2208-2220. IF: 17,4.
7. Ouahed J, Spencer E, **Kotlarz D**, Shouval DS, Kowalik M, Peng K, Field M, Grushkin-Lerner L, Pai SY, Bousvaros A, Cho J, Argmann C, Schadt E, McGovern DPB, Mokry M, Nieuwenhuis E, Clevers H, Powrie F, Uhlig H, Klein C, Muise A, Dubinsky M, Snapper SB (2019). Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease: A Clinical Approach With a Focus on the Role of Genetics and Underlying Immune Deficiencies. *Inflamm Bowel Dis* 26, 820-842. IF: 4,0.
8. Jardine S, Anderson S, Babcock S, Leung G, Pan J, Dhingani N, Warner N, Guo C, Siddiqui I, **Kotlarz D**, Dowling JJ, Melnyk R, Snapper SB, Klein C, Thiagarajah JR, Muise AM (2019). Drug Screen Identifies Leflunomide for Treatment of Inflammatory Bowel Diseases Caused by TTC7A Deficiency. *Gastroenterology* 19, 41574-41576. IF: 20,9.

9. Khoshnevisan R, Nekooei-Marnany N, Klein C, **Kotlarz D**, Behnam M, Ostadi V, Yaran M, Rezaei A, Sherkat R (2019). IL-12R β 1 deficiency corresponding to concurrency of two diseases, mendelian susceptibility to mycobacterial disease and Crohn's disease. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 17, 100123. IF: 1,0.
10. Nekooie-Marnany N, Deswarte C, Ostadi V, Bagherpour B, Taleby E, Ganjalikhani-Hakemi M, Le Voyer T, Rahimi H, Rosain J, Pourmoghadass Z, Sheikhabaei S, Khoshnevisan R, Petersheim D, **Kotlarz D**, Klein C, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Bustamante J, Sherkat R (2018). Impaired IL-12- and IL-23-Mediated Immunity Due to IL-12R β 1 Deficiency in Iranian Patients with Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease. *J Clin Immunol* 38, 787-793. IF: 4,1.
11. Shouval DS, Konnikova L, Griffith AE, Wall SM, Biswas A, Werner L, Nunberg M, Kammermeier J, Goettel JA, Anand R, Chen H, Weiss B, Li J, Loizides A, Yerushalmi B, Yanagi T, Beier R, Conklin LS, Ebens CL, Santos F, Sherlock M, Goldsmith JD, **Kotlarz D**, Glover SC, Shah N, Bousvaros A, Uhlig HH, Muise AM, Klein C, and Snapper SB (2017). Enhanced TH17 Responses in Patients with IL10 Receptor Deficiency and Infantile-onset IBD. *Inflamm Bowel Dis* 23, 1950-1961. IF: 4,5.
12. Petersen BS, August D, Abt R, Alldafari M, Atarod L, Baris S, Bhavsar H, Brinkert F, Buchta M, Bulashevskaya A, Chee R, Cordeiro AI, Dara N, Duckers G, Elmarsafy A, Frede N, Galal N, Gerner P, Glocker EO, Goldacker S, Hammermann J, Hasselblatt P, Havlicekova Z, Hubscher K, Jesenak M, Karaca NE, Karakoc-Aydiner E, Kharaghani MM, Kilic SS, Kiykim A, Klein C, Klemann C, Kobbe R, **Kotlarz D**, Laass MW, Leahy TR, Mesdaghi M, Mitton S, Neves JF, Ozturk B, Pereira LF, Rohr J, Restrepo JLR, Ruzaike G, Saleh N, Seneviratne S, Senol E, Speckmann C, Tegtmeyer D, Thankam P, van der Werff-Ten Bosch J, von Bernuth H, Zeissig S, Zeissig Y, Franke A, and Grimbacher B (2017). Targeted Gene Panel Sequencing for Early-onset Inflammatory Bowel Disease and Chronic Diarrhea. *Inflamm Bowel Dis* 23, 2109-2120. IF: 4,5.
13. Bahrami E, Witzel M, Racek T, Puchalka J, Hollizeck S, Greif-Kohistani N, **Kotlarz D**, Horny HP, Feederle R, Schmidt H, Sherkat R, Steinemann D, Gohring G, Schlegelbeger B, Albert MH, Al-Herz W, and Klein C (2017). Myb-like, SWIRM, and MPN domains 1 (MYSM1) deficiency: Genotoxic stress-associated bone marrow failure and developmental aberrations. *J Allergy Clin Immunol* 17,30050-30057. IF: 12,5.
14. Lexmond WS, Goettel JA, Lyons JJ, Jacobse J, Deken MM, Lawrence MG, DiMaggio TH, **Kotlarz D**, Garabedian E, Sackstein P, Nelson CC, Jones N, Stone KD, Candotti F, Rings EH, Thrasher AJ, Milner JD, Snapper SB, and Fiebigler E (2016). FOXP3+ Tregs require WASP to restrain Th2-mediated food allergy. *J Clin Invest* 126, 4030-4044. IF: 12,8.
15. Li Q, Lee CH, Peters LA, Mastropaolo LA, Thoeni C, Elkadri A, Schwerd T, Zhu J, Zhang B, Zhao Y, Hao K, Dinarzo A, Hoffman G, Kidd BA, Murchie R, Al Adham Z, Guo C, **Kotlarz D**, Cutz E, Walters TD, Shouval DS, Curran M, Dobrin R, Brodmerkel C, Snapper SB, Klein C, Brumell JH, Hu M, Nanan R, Snanter-Nanan B, Wong M, Le Deist F, Haddad E, Roifman CM, Deslandres C, Griffiths AM, Gaskin KJ, Uhlig HH, Schadt EE, and Muise AM (2016). Variants in TRIM22 That Affect NOD2 Signaling Are Associated With Very-Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 150, 1196-1207. IF: 18,4.
16. Kreins AY, Ciancanelli MJ, Okada S, Kong XF, Ramirez-Alejo N, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Mahdavian SA, Ailal F, Bousfiha A, Mansouri D, Nievas E, Ma CS, Rao G, Bernasconi A, Sun Kuehn H, Niemela J, Stoddard J, Deveau P, Cobat A, El Azbaoui

- S, Sabri A, Lim CK, Sundin M, Avery DT, Halwani R, Grant AV, Boisson B, Bogunovic D, Itan Y, Moncada-Velez M, Martinez-Barricarte R, Migaud M, Deswarte C, Alsina L, **Kotlarz D**, Klein C, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Cormier-Daire V, Rose-John S, Picard C, Hammarstrom L, Puel A, Al-Muhsen S, Abel L, Chaussabel D, Rosenzweig SD, Minegishi Y, Tangye SG, Bustamante J, Casanova JL, and Boisson-Dupuis S (2015). Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med* 212, 1641-1662. IF: 11,2.
17. Triot A, Jarvinen PM, Arostegui JI, Murugan D, Kohistani N, Dapena Diaz JL, Racek T, Puchalka J, Gertz EM, Schaffer AA, **Kotlarz D**, Pfeifer D, Diaz de Heredia Rubio C, Ozdemir MA, Patiroglu T, Karakukcu M, Sanchez de Toledo Codina J, Yague J, Touw IP, Unal E, and Klein C (2014). Inherited biallelic CSF3R mutations in severe congenital neutropenia. *Blood* 123, 3811-3817. IF: 10,5.
 18. Avitzur Y, Guo C, Mastropaolo LA, Bahrami E, Chen H, Zhao Z, Elkadri A, Dhillon S, Murchie R, Fattouh R, Huynh H, Walker JL, Wales PW, Cutz E, Kakuta Y, Dudley J, Kammermeier J, Powrie F, Shah N, Walz C, Nathrath M, **Kotlarz D**, Puchaka J, Krieger JR, Racek T, Kirchner T, Walters TD, Brumell JH, Griffiths AM, Rezaei N, Rashtian P, Najafi M, Monajemzadeh M, Pelsue S, McGovern DP, Uhlig HH, Schadt E, Klein C, Snapper SB, and Muise AM (2014). Mutations in tetratricopeptide repeat domain 7A result in a severe form of very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 146, 1028-1039. IF: 16,7.
 19. Neven B, Mamessier E, Bruneau J, Kaltenbach S, **Kotlarz D**, Suarez F, Masliah-Planchon J, Billot K, Canioni D, Frange P, Radford-Weiss I, Asnafi V, Murugan D, Bole C, Nitschke P, Goulet O, Casanova JL, Blanche S, Picard C, Hermine O, Rieux-Laucat F, Brousse N, Davi F, Baud V, Klein C, Nadel B, Ruemmele F, and Fischer A (2013). A Mendelian predisposition to B-cell lymphoma caused by IL-10R deficiency. *Blood* 122, 3713-3722. IF: 9,8.
 20. Grote K, Sonnenschein K, Kapopara PR, Hillmer A, Grothusen C, Salguero G, **Kotlarz D**, Schuett H, Bavendiek U, and Schieffer B (2013). Toll-like receptor 2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 promotes reendothelialization and inhibits neointima formation after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2097-2104. IF: 5,5.
 21. Abdollahpour H, Appaswamy G, **Kotlarz D**, Diestelhorst J, Beier R, Schaffer AA, Gertz EM, Schambach A, Kreipe HH, Pfeifer D, Engelhardt KR, Rezaei N, Grimbacher B, Lohrmann S, Sherkat R, and Klein C (2012). The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood* 119, 3450-3457. IF: 9,1.
 22. Gardiwal A, Reissmann LM, **Kotlarz D**, Oswald H, Korte T, Landmesser U, Klein G, and Templin C (2009). Arrhythmia susceptibility in mice after therapy with beta-catenin-transduced hematopoietic progenitor cells after myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiology* 114, 199-207. IF 2010: 2,0.
 23. Templin C, **Kotlarz D**, Faulhaber J, Schnabel S, Grote K, Salguero G, Luchtefeld M, Hiller KH, Jakob P, Naim HY, Schieffer B, Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Limbourg FP, and Drexler H (2008). Ex vivo expanded hematopoietic progenitor cells improve cardiac function after myocardial infarction: role of beta-catenin transduction and cell dose. *J Mol Cell Cardiol* 45, 394-403. IF 2010: 5,5.
 24. Salguero G, Akin E, Templin C, **Kotlarz D**, Doerries C, Landmesser U, Grote K, and Schieffer B (2008). Renovascular hypertension by two-kidney one-clip enhances endothelial progenitor cell mobilization in a p47phox-dependent manner. *J Hypertens* 26, 257-268. IF 2010: 4,0.

25. Templin C, **Kotlarz D**, Marquart F, Faulhaber J, Brendecke V, Schaefer A, Tsikas D, Bonda T, Hilfiker-Kleiner D, Ohl L, Naim HY, Foerster R, Drexler H, and Limbourg FP (2006). Transcoronary delivery of bone marrow cells to the infarcted murine myocardium: feasibility, cellular kinetics, and improvement in cardiac function. *Basic Res Cardiol* 101, 301-310. IF 2010: 6,1.
26. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, Heineke J, **Kotlarz D**, Xu J, Molkentin JD, Niessen HW, Drexler H, and Wollert KC (2006). The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 98, 351-360. IF 2010: 9,5.
27. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, **Kotlarz D**, Mueller M, Fuchs M, Hornig B, Haller H, and Drexler H (2004). Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 110, 1933-1939. IF 2010: 14,4.

7.3 Übersichtsartikel/Reviews

1. Li Y, Klein C, **Kotlarz D**[#] (2020). Dysregulation of Cell Death in Human Chronic Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12, a037036. IF: 9,1.
2. **Kotlarz D**, Zietara N, Milner JD, and Klein C (2014). Human IL-21 and IL-21R deficiencies: two novel entities of primary immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr* 26, 704-712. IF: 2,5.
3. Glocker EO, **Kotlarz D**, Klein C, Shah N, and Grimbacher B (2011). IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1246, 102-107. IF: 3,2.

8 Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsschrift

* equal contribution, # corresponding author

1. Khoshnevisan R, Anderson M, Babcock S, Anderson S, Illig D, Marquardt B, Sherkat R, Schröder K, Moll F, Hollizeck S, Rohlf s M, Walz C, Adibi P, Rezaei A, Andalib A, Koletzko S, Muise AM, Snapper SB, Klein C, Thiagarajah JR*[#], **Kotlarz D***[#] (2020). Human NOX1 deficiency is associated with altered collective and planktonic cell migration - Insights from Patients with Pediatric-Onset IBD. *Inflamm Bowel Dis* 26, 1166-1176. IF: 4,3.
2. Magg T, Shcherbina A, Arslan D, Desai MM, Wall S, Mitsialis V, Conca R, Unal E, Karacabey N, Mukhina A, Rodina Y, Taur PD, Illig D, Marquardt B, Hollizeck S, Jeske T, Gothe F, Schober T, Rohlf s M, Koletzko S, Lurz E, Muise AM, Snapper SB, Hauck F, Klein C, **Kotlarz D**[#] (2019). CARMIL2 Deficiency Presenting as Very Early Onset Inflamm Bowel Dis 25, 1788-1795. IF: 4,0.
3. Goettel JA*, **Kotlarz D***, Canavan JB, Konnikova L, Illig D, Frei SM, Emani R, Field M, Gringauz J, Wall SM, Griffith AE, Friedman JR, Towne JE, Plevy SE, Hall AOH, Snapper SB (2019). Low-Dose Interleukin-2 Ameliorates Colitis in a Preclinical Humanized Mouse Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 8, 193-195. IF: 7,1.
4. Illig D, Navratil M, Kelečić J, Conca R, Hojsak I, Jadrešin O, Ćorić M, Vuković J, Rohlf s M, Hollizeck S, Bohne J, Klein C*, **Kotlarz D***[#] (2019). Alternative Splicing Rescues Loss of Common Gamma Chain Function and Results in IL-21R-like Deficiency. *J Clin Immunol* 39, 207-215. IF: 6,8.
5. Li Y, Führer M, Bahrami E, Socha P, Klaudel-Dreszler M, Bouzidi A, Liu Y, Lehle AS, Magg T, Hollizeck S, Rohlf s M, Conca R, Field M, Warner N, Mordechai S, Shteyer E, Turner D, Boukari R, Belbouab R, Walz C, Gaidt M, Hornung V, Baumann B, Pannicke U, Al Idrissi E, Alghamdi HA, Sepulveda F, Gil M, Saint Basile G, Hoenig M, Koletzko S, Muise AM, Snapper SB, Schwarz K*, Klein C*, **Kotlarz D***[#] (2019). Human RIPK1 Deficiency Causes Combined Immunodeficiency and Inflammatory Bowel Diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 970-975. IF: 9,6.
6. Lehle AS, Farin HF, Marquardt B, Michels BE, Magg T, Li Y, Liu Y, Ghalandary M, Lammens K, Hollizeck S, Rohlf s M, Hauck F, Conca R, Walz C, Weiss B, Lev A, Simon AJ, Groß O, Gaidt MM, Hornung V, Clevers H, Yazbeck N, Hanna-Wakim R, Shouval DS, Warner N, Somech R, Muise AM, Snapper SS, Bufler P, Koletzko S, Klein C*, **Kotlarz D***[#] (2019). Intestinal Inflammation and Dysregulated Immunity in Patients with Inherited Caspase-8 Deficiency. *Gastroenterology*, 156, 275-278. IF: 20,9.
7. **Kotlarz D***, Marquardt B*, Barøy T, Lee WS, Konnikova L, Hollizeck S, Magg T, Lehle AS, Walz C, Borggraefe I, Hauck F, Bufler P, Conca R, Wall S, Schumacher EM, Misceo D, Frengen E, Bentsen BS, Uhlig H, Hopfner K-P, Muise AM, Snapper SB, Strømme P, Klein C (2018). Human TGF-β1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy. *Nature Genetics* 50, 344–348. IF: 27,1.
8. Murugan D, Albert MH, Langemeier J, Bohne J, Puchalka J, Jarvinen PM, Hauck F, Klenk AK, Prell C, Schatz S, Diestelhorst J, Sciskala B, Kohistani N, Belohradsky BH, Muller S, Kirchner T, Walter MR, Bufler P, Muise AM, Snapper SB, Koletzko S, Klein C, and **Kotlarz D**[#] (2014). Very early onset inflammatory bowel disease associated with aberrant trafficking of IL-10R1 and cure by T cell replete haploidentical bone marrow transplantation. *J Clin Immunol* 34, 331-339. IF: 3,2.

9. **Kotlarz D***, Beier R*, Murugan D*, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, Pfeifer D, Kreipe H, Pfister ED, Baumann U, Puchalka J, Bohne J, Egritas O, Dalgic B, Kolho KL, Sauerbrey A, Buderus S, Gungor T, Enninger A, Koda YK, Guariso G, Weiss B, Corbacioglu S, Socha P, Uslu N, Metin A, Wahbeh GT, Husain K, Ramadan D, Al-Herz W, Grimbacher B, Sauer M, Sykora KW, Koletzko S, and Klein C (2012). Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* 143, 347-355. IF: 12,8.
10. Glocker EO*, **Kotlarz D***, Boztug K*, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, and Klein C (2009). Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361, 2033-2045. IF: 47,1.

9 Danksagung

Es ist mir ein großes Anliegen die Gelegenheit zu nutzen, zahlreichen Personen für Ihre Unterstützung meines wissenschaftlichen und klinischen Werdegangs zu danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem geschätzten Mentor Prof. Dr. med. Dr. sci. nat Christoph Klein, da er mich über viele Jahre auf meinem akademischen Werdegang nachhaltig gefördert hat. Prof. Christoph Klein hat mein Interesse für die Erforschung von primären Immundefekterkrankungen und frühkindlichen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen geweckt. Durch seine stete Begleitung konnte ich meinen Kollaborationshorizont erweitern und ein eigenständiges, kompetitives Forschungsprofil zu einem medizinisch hochrelevanten Forschungsthema entwickeln. Ich danke Herrn Prof. Klein für die zahlreichen fachlichen Ratschläge, die anregenden Diskussionen und den engen wissenschaftlichen Austausch.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Scott Snapper für sein Mentoring danken, da er mir durch ein Postdoctoral Fellowship in seinem Labor am Boston Children's Hospital der Harvard Medical School die Möglichkeit gegeben hat, neue wissenschaftliche Eindrücke zu gewinnen und mein Forschungsprofil durch die Adaptation innovativer Methoden zu stärken. Zudem möchte ich Frau Prof. Dr. med. Sibylle Koletzko für Ihr Mentoring im Bereich der Pädiatrischen Gastroenterologie danken, da sie es mir ermöglicht hat, die translationale Forschung und Patientenversorgung eng zu verknüpfen.

Einen ausdrücklichen Dank möchte ich zudem an meine Fachmentoren Herr Prof. Dr. med. Stefan Endres und Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker aussprechen, da sie meinen akademischen Werdegang an der LMU über die Betreuung der Habilitation hinaus auf verschiedenen Ebenen begleitet haben.

Selbstverständlich stellt eine Habilitation letztendlich ein große Teamleistung dar, so dass ich vielen, unterstützenden Personen danken möchte, ohne deren Zusammenarbeit unserer translationale Forschung nicht möglich gewesen wäre. So möchte ich einen besonderen Dank an meine wissenschaftlichen und ärztlichen Kollegen, das administrative Team, das LMU Klinikum, und die zahlreichen nationalen bzw. internationalen Kollaborationspartner aussprechen. Ein herzlicher Dank gilt selbstverständlich meinen ehemaligen bzw. aktuellen Arbeitsgruppenmitgliedern, die wesentlich zum Gelingen dieser Habilitation beigetragen und eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Es ist für mich weiterhin eine große Freude mit so vielen kreativen und motivierten Persönlichkeiten zusammenarbeiten zu dürfen.

Darüber hinaus möchte ich selbstverständlich auch den vielen Förderern danken, die meine Forschung über Drittmittel, Stipendien, Preise und ideelle Förderungen unterstützt haben und damit die Voraussetzung für unsere translationale Forschung geschaffen haben.

Ein besonderer Dank gilt den PatientenInnen und betroffenen Familien, die die eigentliche Motivation für unsere translationale Forschung darstellen. Unser Ziel ist darauf ausgerichtet, mit einem großen Engagement in einem interdisziplinären Team und Kollaborationsnetzwerk entgegen ökonomischer und gesellschaftlicher Zwänge die translationale Forschung voranzutreiben, um möglichst vielen Kindern mit einer lebensbedrohlichen Erkrankung zielgerichtete Diagnosen und optimierte Therapieverfahren zu ermöglichen.

Abschließend möchte ich von tiefstem Herzen meiner Familie für die langjährige und uneingeschränkte Unterstützung danken. Ein ganz besonderes und mir persönlich sehr wichtiges Dankeswort gilt dabei meinen Eltern, welche mir meine Ausbildung erst ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Im gleichen Atemzug möchte ich meiner großen Liebe und meinen Kindern von Herzen danken, da sie mir immer mit Ihrer außergewöhnlichen liebevollen Zuneigung, Geduld und Motivation den notwendigen Rückhalt und die Kraft für die Forschung gegeben haben. Meine Familie und Freunde mussten oft zugunsten der wissenschaftlichen Arbeiten auf eine gemeinsame Zeit verzichten und für das Verständnis bzw. die verständnisvolle Unterstützung möchte ich Euch recht herzlich danken. Ohne Euren Rückhalt wäre der große Einsatz für die Forschung nicht möglich gewesen.