

DISSERTATION

Charakterisierung des Interferonsignalweges in T- und B-Zellsubpopulationen bei COVID-19 Erkrankung und beim primären Sjögren Syndrom

Characterization of the interferon signaling pathway in T and B cell subsets in COVID-19 disease and Sjögren's disease

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jacob Casimir Ritter

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Thomas Dörner

Datum der Promotion: 20.06.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis.....	viii
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	5
1.1. Der Interferon-Signalweg	5
1.2. Interferone in der viralen Immunantwort bei COVID-19	7
1.3. Die Rolle der Interferone bei Autoimmunerkrankungen	8
1.4. Das primäre Sjögren Syndrom	9
1.5. Die Rolle des Interferons in der Pathophysiologie des primären Sjögren Syndroms	9
1.6. Asymptomatische Anti-SSA Frauen und das Risiko für einen kongenitalen Herzblock bei Schwangerschaften	10
1.7. Therapeutische Optionen der Interferon-Blockierung und ihre Limitationen	11
1.8. Spezifische Fragestellung.....	13
2. Methodik	14
2.1. Patient:innenkollektiv und Blutproben	14
2.2. Immunphänotypisierung im peripheren Blut.....	15
2.2.1. Antikörperliste	16
2.2.2. Durchflusszytometrie.....	18
2.2.3. T- und B-Zellsubpopulationen.....	18
2.3. Siglec-1 Expression auf CD14 ⁺ Monozyten	19
2.4. Gewinnung von PBMCs mittels Ficoll-Lösungen.....	20
2.5. Funktionelle Analysen durch IFN α und IFN γ Stimulationsexperimente.....	21
2.5.1. Kurzzeitstimulation	21
2.5.2. 48h Langzeitstimulation	21

2.6.	Statistik	21
3.	Ergebnisse.....	23
3.1.	Erhöhte Interferon Signalmoleküle in COVID-19 Erkrankten	23
3.2.	STAT1 Werte im Verlauf nach SARS-CoV-2 mRNA Vakzinierung.....	24
3.3.	Erhöhte STAT1 Werte bei Anti-SSA positiven, klinisch asymptomatischen Frauen mit einem erhöhten Risiko für einen kongenitalen Herzblock.....	26
3.4.	Jak/STAT Signalweg in T- und B Zellsubpopulationen im primären Sjögren Syndrom	28
3.5.	IFN-Signalmoleküle korrelieren mit der humoralen Autoimmunität.....	30
3.6.	Monitoring von Subgruppen und Krankheitsaktivität im primären Sjögren Syndrom	32
3.7.	Einfluss von Jak Inhibition auf den Jak/STAT Signalweg in B-Zellsubpopulationen	34
4.	Diskussion	35
4.1.	Kurze Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	35
4.2.	Interpretation der Ergebnisse und Einbettung in den Forschungsstand.....	35
4.3.	Stärken und Limitationen	38
4.4.	Implikationen für die Praxis und zukünftige Forschung	39
5.	Schlussfolgerungen.....	41
	Literaturverzeichnis.....	42
	Eidesstattliche Versicherung	49
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	50
	Auszug aus der Journal Summary List (2022)	52
	Druckexemplar der <i>Publikation 1</i>	55
	Auszug aus der Journal Summary List (2022)	67
	Druckexemplar der <i>Publikation 2</i>	68
	Lebenslauf.....	80
	Komplette Publikationsliste	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studienpopulation der Publikation Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J et al. (2022).....	14
Tabelle 2: Studienpopulation der Publikation Ritter J et al. (2024).....	15
Tabelle 3: Antikörperliste mit Fluorochrom und Volumen zur genauen Immunphänotypisierung von B-Zellsubpopulationen.....	16
Tabelle 4: Antikörperliste mit Fluorochrom und Volumen zur Immunphänotypisierung von T- und B-Zellsubpopulationen.....	17
Tabelle 5: Signalmoleküle des Interferonsignalweges.....	17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Typ I und II IFN Jak/STAT Signalkaskade in der Zelle.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher therapeutischer Zielstrukturen im IFN Signalweg.	12
Abbildung 3: Gating-Strategie der Durchflusszytometrie.	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gewinnung von PBMC Zellen aus Vollblut.	20
Abbildung 5: Erhöhte STAT1 Werte bei COVID 19 Erkrankten und in Gesunden durch Langzeitstimulation mit Interferon.....	24
Abbildung 6: STAT1 Werte im Follow-up nach Vakzinierung in T- und B Zellen.....	25
Abbildung 7: IFN-Signalmoleküle und die Verteilung von B-Zellsubpopulationen in gesunden Anti-SSA positiven Frauen mit einem erhöhten Risiko für einen kindlichen Herzblock.	27
Abbildung 8: Erhöhte IFN-Signalwegmoleküle in T- und B Zellen im primären Sjögren Syndrom.	30
Abbildung 9: STAT1 und IRF9 Werte in B-Zellsubpopulationen korrelieren mit charakteristischen serologischen Autoimmunbefunden.	31
Abbildung 10: STAT1 als Biomarker zur Identifizierung von Subgruppen und IRF9 als Krankheitsaktivitätsmarker.....	33
Abbildung 11: Einfluss von Jak-Inhibition auf Signalmoleküle des Jak/STAT Signalweges in rheumatoider Arthritis.....	34

Abkürzungsverzeichnis

ANA	Antinukleäre Antikörper
AUC	area under the curve
cGAS	cyclic GMP-AMP synthetase
CHB	kongenitaler Herzblock
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
dsDNA	double stranded Desoxyribonukleinsäure
ESSDAI	European Sjögren Syndrome Disease Activity Index
EULAR	European Alliance of Associations for Rheumatology
FSC	Forward scatter Plot
GAS	Interferon-gamma-activated site
HD	gesunde Kontrollen (healthy donors)
IFN	Interferon
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
IRF7	Interferon Regulatory Factor 7
IRF9	Interferon Regulatory Factor 9
ISG	Interferon-stimulated genes
ISGF3	Interferon Stimulated Gene Factor 3
ISRE	Interferon stimulated response element
JAK1	Januskinase 1
MFI	Median Fluorescence Intensity
MHC	Major-histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MWU	Mann Whitney U Test
n	Anzahl
p	phosphoryliert
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PRR	Pattern Recognition Receptors
pSS/SjD	primäres Sjögren Syndrom
RF	Rheumafaktor
rpm	rounds per minute

ROC	Receiver operating characteristic curve
RT	Raumtemperatur
Sars-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2
SD	Standardabweichung
SLE	systemischer Lupus erythematodes
ssRNA	single stranded Ribonukleinsäure
SSC	Siteward scatter Plot
STAT1/2	Signal Transducers and Activators of Transcription 1/2
Tyk2	Tyrosinkinase 2
TLR	Toll-like-receptors
U	unphosphoryliert

Zusammenfassung

Einführung

Interferone (IFN) sind sowohl in der viralen Immunabwehr von Sars-CoV 2 Viren als auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie dem primären Sjögren Syndrom (pSS) von wesentlicher Bedeutung. Gleichzeitig sind die Zellen des adaptiven Immunsystems maßgeblich an der spezifischen viralen Immunabwehr beteiligt. Auf der anderen Seite spielen B-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des pSS.

Methoden

Periphere T- und B-Zellsubpopulationen von COVID-19 Patient:innen, pSS-Patient:innen, sowie gesunden Kontrollen wurden hinsichtlich ihres Expressionsniveaus von IFN-Signalmolekülen (STAT1/2, IRF1, IRF9) in T- und B-Zellsubpopulationen analysiert. Zusätzlich wurden relevante Phosphorylierungsstellen nach IFN Stimulation untersucht und die Krankheitsaktivität, sowie klinische und serologische Merkmale ausgewertet.

Ergebnisse

Es konnten erhöhte STAT1, STAT2 und IRF9 Moleküle in allen T- und B-Zellsubpopulationen von Patient:innen mit milder und schwerer COVID-19 Erkrankung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Interessanterweise zeigten schwere COVID-19 Verläufe eine Tendenz zu niedrigeren IFN-Signalwegmolekülen im Vergleich zu leichteren Verläufen. Nach 48h IFN α und IFN γ Stimulation fanden sich deutlich erhöhte STAT1 Proteine in Gesunden und in milden COVID-19 Erkrankten. Diese Erhöhung fiel bei schweren COVID-19 Verläufen weniger deutlich aus.

Im zweiten Teil wiesen pSS Patient:innen in den meisten T- und B-Zellsubpopulationen erhöhte Werte von Molekülen des IFN-Signalweges auf. Zusätzlich lag bei pSS Patient:innen im Vergleich zu HDs *ex vivo* im Grundzustand ein geringeres Verhältnis von phosphoryliertem STAT1 und STAT2 zum entsprechenden unphosphorylierten Protein vor. Gleichzeitig zeigten B-Zellsubpopulationen von pSS Patient:innen erhöhte STAT1 Phosphorylierungen nach IFN-Stimulation. Hohe STAT1- und IRF9-Konzentrationen in B-Zellen beim pSS waren signifikant mit einer Hypergammaglobulinämie sowie mit Anti-SSA Autoantikörpern verbunden. Des Weiteren konnte STAT1 als Biomarker zur Identifikation von pSS Patient:innen mit extraglandulären Manifestation genutzt werden. Die

IRF9-Werte korrelierten in T- und B-Zellsubpopulationen mit dem Krankheitsaktivitätsindex (ESSDAI).

Schlussfolgerung

Insgesamt zeigt die vorliegende Dissertation, dass bei Patient:innen mit COVID-19 Erkrankung ein aktivierter IFN-Signalweg in T- und B-Zellen vorliegt, welcher in schweren COVID-19 Verläufen reduziert ist.

Es konnte beim pSS eine verstärkte chronische IFN-Signalwegaktivierung in T- und B-Zellen gefunden werden. Diese Dauerstimulation spiegelt sich in erhöhter serologischer Autoimmunität wider. Zusätzlich konnte STAT1 als Biomarker für extraglanduläre pSS Manifestationen identifiziert werden, während IRF9-Werte als Biomarker für die Krankheitsaktivität eingesetzt werden können.

Abstract

Introduction

Interferons (IFN) are essential in the viral immune defence of Sars-CoV 2 viruses as well as in the pathogenesis of autoimmune diseases such as Sjögren's disease (SjD). At the same time the cells of the adaptive immune system are significantly involved in the specific viral immune defence. On the other hand, B cells play an important role in the pathophysiology of SjD.

Methods

Peripheral T and B cell subsets of COVID-19 patients, SjD patients and healthy controls (HDs) were analyzed for their expression levels of IFN signaling molecules (STAT1/2, IRF1, IRF9) in T and B cell subsets. In addition, the phosphorylation sites were analyzed after IFN stimulation. Disease activity, associated clinical and serological characteristics were also evaluated.

Results

Increased STAT1, STAT2 and IRF9 molecules were detected in all T and B cell subsets of patients with mild and severe COVID-19 disease compared to the healthy control group. Interestingly, severe COVID-19 courses showed a tendency towards lower IFN signaling pathway molecules compared to milder courses. After 48h of IFN α and IFN γ stimulation, significantly increased STAT1 proteins were found in healthy individuals and in mild COVID-19 patients. This increase was not as pronounced in severe COVID-19 cases.

In the second part, SjD patients showed increased levels of IFN signaling pathway molecules in most T and B cell subsets. In addition, SjD patients had a lower ratio of phosphorylated STAT1 and STAT2 to the corresponding unphosphorylated protein compared to HDs *ex vivo*. At the same time, B-cell subsets of SjD patients showed increased STAT1 phosphorylation after IFN stimulation. High STAT1 and IRF9 levels in B cells in SjD were significantly associated with hypergammaglobulinaemia and Anti-SSA autoantibodies. Furthermore, STAT1 could be used as a biomarker to identify SjD patients with extraglandular manifestations. IRF9 values correlated with the EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI) in T and B cell subsets.

Conclusion

Overall, the present work shows that patients with COVID-19 disease have an activated IFN signaling pathway in T and B cell subsets, which is disrupted in severe COVID-19 courses.

SjD patients show increased chronic IFN signaling pathway activation in T and B cell subsets, which maintains permanent stimulation of T and B cells. This is reflected in increased serological autoimmunity. In addition, STAT1 was identified as a biomarker for extraglandular SjD manifestations, while IRF9 values could be used as a biomarker for disease activity.

1. Einleitung

1957 entdeckten die beiden Virologen Alack Isaacs und Jean Lindemann das Zytokin Interferon (IFN) (1). Seitdem wurden zahlreiche physiologische als auch pathologische Erkenntnisse im Zusammenhang mit IFN veröffentlicht. Bisher wurden 21 Interferonuntergruppen (u.a. IFN α und IFN γ) beschrieben, welche sich in drei große Interferonklassen (Typ I, II, III) unterteilen lassen. Je nach Interferonklasse werden unterschiedliche Rezeptoren und Signalwege aktiviert und führen zur Expression von bis zu tausenden IFN-stimulierter Genen (ISGs) (2).

Physiologisch nehmen dabei Interferone eine zentrale Rolle in der viralen Immunantwort ein und dienen als Modulator des Immunsystems. Auf der anderen Seite wird eine pathologisch erhöhte Interferonaktivität mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht. Dies gilt insbesondere für Autoimmunerkrankungen aus dem Formenkreis der Kollagenosen, wie dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und dem primären Sjögren Syndrom (pSS).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Interferonsignalweg in T- und B Zellsubpopulationen in der viralen Erkrankung Covid-19 und in der Kollagenose primäres Sjögren Syndrom näher untersucht.

1.1. Der Interferon-Signalweg

Interferone binden extrazellulär an Interferon-Rezeptoren und initiieren eine intrinsische Signalkaskade. Diese klassische Signalkaskade beruht auf der Aktivierung der Rezeptoren durch IFN und einer ausgelösten Phosphorylierungssignalkette (2, 3).

Typ I Interferone (u.a. IFN α) binden an die oberflächlichen IFN-alpha-Rezeptorketten und initiieren dadurch eine Autophosphorylierung der assoziierten Janus kinases 1/Tyrosine kinases 2 (JAK1/Tyk2). Dies führt zur Phosphorylierung von Signal Transducers and Activators of Transcription 1 (STAT1) und STAT2, welche als phosphorylierte (p)STAT1/pSTAT2 Heterodimer mit Interferon regulatory factor 9 (IRF9) interagieren (2). Dieser Komplex wird als Interferon-stimulated Gene factor 3 (ISGF3) bezeichnet und gelangt zum Nukleus, wo er spezifisch am IFN-stimulated response element (ISRE) bindet und zahlreiche Interferon assoziierte Gene aktiviert (2).

Typ II IFN (u.a. IFN γ) binden an den IFN gamma-Rezeptor und initiieren eine Autophosphorylierung der JAK1/JAK2-assozierten Rezeptorkinasen. Anschließend wird STAT1

phosphoryliert und bildet pSTAT1/pSTAT1 Homodimere, welche in den Nukleus wandern und dort an der IFN gamma-activated site (GAS) Element binden und die Transkription zahlreicher IFN assoziierter Gene (ISGs) auslösen (2, 3).

Darüber hinaus wird die Transkription Interferon-induzierter Gene durch verschiedene weitere IRFs reguliert. Unter anderem induzieren Typ I und II Interferone den Interferon-regulatory factor 1 (IRF1), welcher daraufhin mehrere ISGs beeinflusst (4).

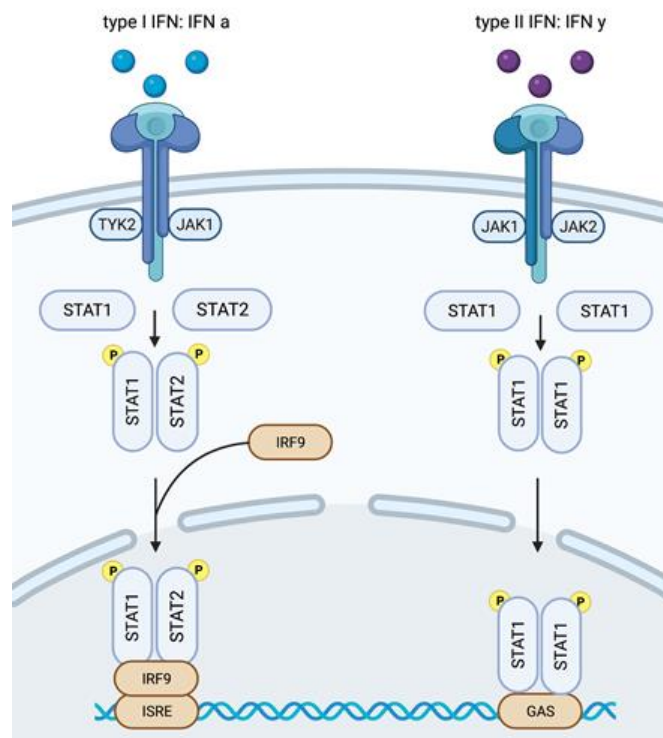


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Typ I und II IFN Jak/STAT Signalkaskade in der Zelle.

Tyrosine Kinase 2 (Tyk2); Janus Kinase 1, 2 (JAK1, JAK2); Signal Transducer and Transcription 1, 2 (STAT1, STAT2); phosphorylated (P); Interferon Regulatory Factor 9 (IRF9); IFN-stimulated response elements (ISRE); IFN γ -activated site (GAS). Quelle: Originalabbildung aus Ritter et al., 2024 (5).

1.2. Interferone in der viralen Immunantwort bei COVID-19

In der physiologischen antiviralen Immunabwehr des angeborenen Immunsystems spielen Interferone eine entscheidende Rolle. Zu Beginn werden sie maßgeblich von Virus infizierten Zellen und später in großer Menge von *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs) produziert, den Hauptproduzenten von IFN α im Menschen (6).

Intrazelluläre *Pattern recognition receptors* (PRRs) erkennen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Im Falle von Viren sind dies Nukleinsäuren. Dies geschieht durch endosomale Toll-like Rezeptoren (TLRs), insbesondere TLR3, 7 und 9, zytosolische *RIG-I-like-receptors* und zytosolische zyklische GMP-AMP Synthase (cGAS) (7). Als Folge der Aktivierung kommt es unter anderem über verschiedene Kinasen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7, welches zur Produktion von Interferonen und weiteren Zytokinen führt (7). Durch die Produktion von Interferonen kommt es zur Aktivierung von hunderten, so genannter Interferon-stimulierter Gene, welche in der direkten antiviralen Abwehr, der Rekrutierung von Immunzellen, der Verhinderung von viraler Replikation und in der Expression und Hochregulierung von Histokompatibilitätskomplexen (MHC-I und MHC-II) beteiligt sind (8).

All diese Funktionen werden durch IFN Rezeptoren und folgender Aktivierung des IFN Signalweges in den Zellen gesteuert und reguliert. Fehler in diesem komplexen Zusammenspiel können zu einer gestörten viralen Clearance mit schwereren Krankheitsverläufen oder zu überschießenden Immunantworten, einschließlich autoinflammatorischer Antworten, führen.

Während der ab Februar 2020 auftretenden COVID-19 Pandemie nahm die körpereigene virale Immunabwehr eine zentrale Rolle ein. Dies war auch darauf zurückzuführen, dass zu Beginn der Pandemie keine bestehende Grundimmunisierung gegen SARS-CoV 2 Viren in der Bevölkerung vorhanden war und Vakzinierungen noch nicht verfügbar waren. Diese besondere Situation bot die einmalige Chance in größeren Kohorten primäre Infektionen eines bis dahin unbekanntes viralen Erreger zu analysieren. Die klinischen Verläufe von SARS-CoV-2 Infektionen reichten von asymptomatischen Infektionen über milde sowie schwere Erkrankungsverläufe bis hin zu letalen Verläufen. Neben Risikofaktoren wie dem Alter oder Übergewicht konnten auch Defekte in der Interferon Immunantwort festgestellt werden. Dabei wurden schwerere Verläufe im Zusammenhang mit angeborenen Genfehlern in Interferon assoziierten Genen (z.B. IRF7, IRF3 und IFNAR1)

beschrieben (9). Zusätzlich konnte in 2,6% der Frauen und in 12,5% der Männer neutralisierende Autoantikörper gegen Interferone detektiert werden, welche zu einer verminderten IFN-Aktivität führten und lebensbedrohliche COVID-19 Erkrankungen hervorriefen (10). Wie sich die unterschiedlichen klinischen Manifestationen auf die IFN Signalkaskade des adaptiven Immunsystems, insbesondere T- und B-Zellsubpopulationen, auswirken, ist bisher unklar. Teile dieser Dissertationsarbeit befassen sich daher mit dem Interferonsignalweg in T- und B-Zellsubpopulationen bei Patient:innen mit milder und schwerer COVID-19 Erkrankung (11).

1.3. Die Rolle der Interferone bei Autoimmunerkrankungen

Neben der protektiven und physiologischen Rolle des Interferons bei der viralen Abwehr, wurde in den letzten Jahren auch eine pathologische und überstimulierende Wirkung von Interferonen insbesondere bei Autoimmunerkrankungen beschrieben.

In dem Zusammenhang sind für verschiedene Autoimmunerkrankungen erhöhte IFN Konzentrationen, überexprimierte IFN stimulierte Gene und Zusammenhänge mit schwereren Krankheitsverläufen beschrieben worden (12, 13). Insbesondere bei Erkrankungen aus dem Formenkreis der Kollagenosen (u.a. SLE und pSS) detektieren endosomale/lysosomale TLR7/9 PRPs körpereigene *single-stranded* Ribonukleinsäuren (ssRNA) und *double-stranded* Desoxyribonukleinsäuren (dsDNA) Immunkomplexe, welche zu einer überschießenden Interferonproduktion führen (14).

In diesem Rahmen konnte gezeigt werden, dass Siglec-1 (CD169) auf CD14⁺ Monozyten mit der IFN α Konzentration in SLE Patient:innen korreliert (15). Seitdem wird Siglec-1 als Interferon- und Krankheitsaktivitätsmarker im SLE und auch zur Unterscheidung von Organbeteiligungen im pSS genutzt (16, 17). Neuere Studien konnten zusätzlich Moleküle des Interferonsignalweges in Lupus B-Zellen untersuchen und bieten so moderne Biomarker an (18).

Insgesamt kommt den Interferonen in rheumatologischen Autoimmunerkrankungen eine wesentliche Rolle zu, es bedarf jedoch einer genaueren molekularen Untersuchung und Einordnung in der komplexen Pathophysiologie.

1.4. Das primäre Sjögren Syndrom

Das primäre Sjögren Syndrom (pSS) stellt dabei eine Autoimmunerkrankung aus dem Formenkreis der Kollagenosen dar und tritt mit einer Prävalenz von ca. 0,01% - 0,05% auf (19). Auch beim pSS ist eine erhöhte Interferonsignatur beschrieben und ist ein wichtiger Faktor in der Pathophysiologie (13, 20). Charakteristisch für die Erkrankung ist eine Lymphozyten Infiltration in die Speichel- und Tränendrüsen, die zu einer lokalen Inflammation und Destruktion der Drüse führt. Dies führt bei Patient:innen zur klassischen Sicca-Symptomatik bestehend aus einem trockenen Mund und Augen (Stomatitis sicca und Konjunktivitis sicca). Begleitend können bei Patient:innen Komorbiditäten wie Fatigue, Angst und Depression auftreten, die mit einer erheblichen Krankheitslast und Verlust an Lebensqualität einhergehen. Neben einer auf die Sicca Symptomatik beschränkten Krankheitsaktivität treten bei 30-40% der pSS Fälle auch systemische, so genannte extraglanduläre, Manifestationen auf (21, 22). Diese können verschiedene Organsysteme betreffen, unter anderem die Gelenke und die Nieren und können im Krankheitsaktivitätsindex (*European Sjögren Syndrome Disease Activity Index* = ESSDAI) erfasst werden (23). Zu beachten ist auch das deutlich erhöhte Risiko ein B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom zu entwickeln (ca. 5% aller pSS Patient:innen) (19, 24).

Charakteristisch und Teil der *American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria* sind die Anti-SSA/Ro Autoantikörper, welche in 33-74% bei pSS Patient:innen vorkommen (25). Weitere serologische Auffälligkeiten sind Anti-SSB/La Antikörper, ANA-Titer, Rheumafaktoren und eine Hypergammaglobulinämie (26). Therapeutisch steht die Symptomlinderung mittels Augentropfen und Speichel-Ersatzprodukten im Vordergrund, während bei systemischer Beteiligung aktuell nur unzureichend unspezifische medikamentöse Ansätze zur Verfügung stehen (u.a. Hydroxychloroquin oder Glukokortikoide) (27).

1.5. Die Rolle des Interferons in der Pathophysiologie des primären Sjögren Syndroms

Die Pathophysiologie des pSS beruht zum großen Teil auf einer pathologischen B-Zell (Hyper-)Aktivität und einer gesteigerten Interferonsignatur.

Hypergammaglobulinämie, antinukleäre Antikörper (ANAs) und Anti-SSA/Anti-SSB Autoantikörper deuten auf eine pathologische Aktivität von B-Zellen und einen

immunologischen Toleranzverlust hin (28). Zusätzlich sind Veränderungen in der Verteilung von B-Zellsubpopulationen im peripheren Blut beschrieben worden. Beim pSS finden sich erhöhte Frequenzen von naiven B Zellen und gleichzeitig erniedrigte pre-switched- und switched-memory B Zellen (29). Außerdem sind die Expansion und Aktivität von autoreaktiven B-Zellen im Blut und Gewebe bei Patient:innen mit pSS beschrieben worden (30).

Neben den B-Zellen kommt dem Interferon eine weitere wesentliche Rolle in der Pathophysiologie des pSS zu. Das Vorhandensein von IFN-Signaturgenen und die Aktivierung des IFN-Systems gelten als Schlüsselmechanismen in der Pathogenese des pSS (20, 31). Zahlreiche Studien konnten die Überexpression von IFN-induzierten Genen in Speicheldrüsengewebe und peripheren Immunzellen beschreiben (13, 32, 33) und mit schwereren Erkrankungsverläufen in Zusammenhang bringen (13, 34).

Daten zu IFN-Signalproteinen in verschiedenen T- und B-Zellsubpopulationen fehlen jedoch und die Schnittstelle zwischen beiden pathophysiologischen Hauptmerkmalen ist bis jetzt kaum untersucht.

1.6. Asymptomatische Anti-SSA Frauen und das Risiko für einen kongenitalen Herzblock bei Schwangerschaften

Autoantikörper gegen SSA/Ro sind charakteristisch für das primäre Sjögren Syndrom, können jedoch auch in gesunden, asymptomatischen Personen auftreten. Im Falle einer Schwangerschaft können Anti-SSA Antikörper über die Plazenta an das ungeborene Kind weitergegeben werden. Dort lösen sie eine Fibrosierung des Reizleitungssystems aus. Dieses kann zu einem AV-Block Grad I-III, einem sogenannten kongenitalen Herzblock (CHB), führen (35). Dabei handelt es sich um eine seltene Komplikation, mit einer Prävalenz von 1:20.000 Geburten (35). Zusätzlich zum Anti-SSA Autoantikörper, spielen Typ I Interferone eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des CHBs (36). Die Identifizierung und das Monitoring dieser seltenen Komplikation bleiben herausfordernd, da insbesondere asymptomatische Frauen mit Anti-SSA+ Autoantikörpern häufig erst durch Schwangerschaftskomplikationen wie Aborte, Totgeburten und kongenitalen Herzblock medizinisch auffallen. Lisney et al. zeigte bereits, dass Siglec-1 als IFN Typ I Signaturmarker in CHB-Schwangerschaften erhöht ist und als Risikomarker für diese Konstellation dient (36). Es bedarf jedoch weiterer genauerer Untersuchungen dieser seltenen Komplikation.

1.7. Therapeutische Optionen der Interferon-Blockierung und ihre Limitationen

Die prominente Interferonsignatur im pSS und deren Assoziation zu schwererer Krankheitsaktivität hat dazu geführt, dass sich aktuell moderne Therapieansätze auf die Beeinflussung von Interferonen konzentrieren (37). Eine große Herausforderung stellt dabei die Heterogenität der Erkrankung dar und die Frage, welche pSS Subgruppen von welcher Therapie profitieren könnten. Des Weiteren wird versucht, durch moderne molekulare Untersuchungen neue Zielstrukturen zu identifizieren und Therapiestrategien zu entwickeln, die sich spezifischer an der Pathophysiologie orientieren.

Insgesamt legen meine und andere Daten nahe, Interferone, IFN-Rezeptoren und Signalkaskaden therapeutisch zu adressieren. Mögliche Zielstrukturen umfassen freie Interferone, den IFN α -Rezeptor mittels Anifrolumab, sowie JAK1- (Filgotinib) und TYK2-Inhibitoren (Deucravacitinib). Erste Ergebnisse von einer randomisierten Phase II Studie, die Filgotinib (JAK1-Inhibitor), Ilnraplenib (SYK-Inhibitor) und Tirabrutinib (BTK-Inhibitor) in Patient:innen mit Sjögren Syndrom untersuchte, zeigten jedoch keine Reduktion der Krankheitsaktivität und verfehlten so den primären Endpunkt (38). Klinische Studien könnten somit von gezieltem Patient:inneneinschluss, z.B. durch die Unterscheidung von pathophysiologischen Subgruppen und einem studienbegleitenden IFN-Monitoring, profitieren.

Zusammenfassend ist die Therapie beim pSS bisher unzureichend bzw. unbefriedigend. Es besteht weiterhin ein großer Bedarf für Therapien, die über die alleinige Symptombehandlung hinaus gehen. Insbesondere die Aufschlüsselung der beteiligten B-Zellen und der Interferonsignalkaskade lassen auf moderne zielgerichtete Therapeutika hoffen.

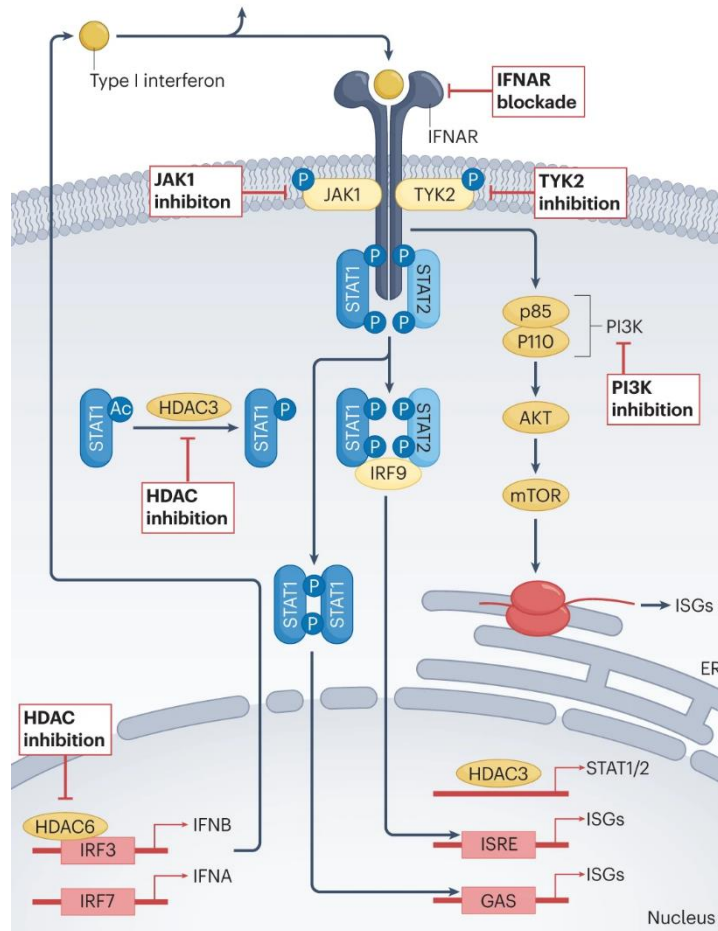


Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher therapeutischer Zielstrukturen im IFN Signalweg.

Interferon-alpha-Rezeptor (IFNAR), Janus kinase 1 (JAK1), Tyrosine kinase 2 (TYK2), signal transducer and transcription 1, 2 (STAT1, STAT2), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), serine-threonine Kinase (AKT), mammalian Target of Rapamycin (mTOR), interferon regulatory factor 9, 3, 7 (IRF9, IRF3, IRF7), Interferon-stimulated-Genes (ISG), IFN-stimulated response elements (ISRE), IFN γ activated site (GAS), Histone Deacetylase Superfamilie (HDAC3), endoplasmatisches Retikulum (ER). Quelle: Originalabbildung aus Verstappen et al., 2023, mit freundlicher Genehmigung vom Springer Nature Verlag (37).

1.8. Spezifische Fragestellung

Im Fokus dieser experimentellen Doktorarbeit steht daher die Untersuchung des Interferonsignalweges in T- und B-Zellsubpopulationen.

Dabei wurden zuerst Patient:innen mit COVID-19 analysiert, um die Rolle des Interferons in der antiviralen Immunabwehr von Sars-CoV 2 Infektionen und dessen Verhältnis zu den klinischen Verläufen zu untersuchen (Publikation 1: Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J et al. (2022) (11)).

Spezifische Fragen:

- Wie läuft die Interferon Signalkaskade (STAT1, STAT2, IRF9) in Zellen des adaptiven Immunsystems bei COVID-19 Erkrankten ab?
- Gibt es abhängig von der Schwere der Erkrankung Unterschiede in diesem intrazellulären Signalweg?
- Wie verhält sich der IFN Signalweg in Zellen von gesunden Kontrollen bei verschiedenen IFN Stimulationen?

Ein weiterer Hauptschwerpunkt lag auf der Untersuchung des IFN-Signalweges in T- und B-Zellsubpopulationen bei Patient:innen mit einem primären Sjögren Syndrom. Dabei sollte erstmalig die Schnittstelle aus beiden wichtigen pathophysiologischen Merkmalen auf Proteinebene untersucht werden und mit der B-Zell Aktivität und klinischen Merkmalen in Verbindung gebracht werden (Publikation 2: Ritter J et al. (2024) (5)).

Spezifische Fragen:

- Wie funktioniert der IFN Signalweg in T- und B-Zellsubpopulationen bei primären Sjögren Syndrom Patient:innen?
- Wie trägt die IFN-Signalübertragung zu den verschiedenen pSS-Merkmalen bei?
- Lassen sich therapeutische Zielstrukturen oder neue Biomarker identifizieren?
- Wie verhält sich der IFN Signalweg bei Anti-SSA positiven gesunden Frauen („at-risk“) im Vergleich zu Frauen mit einem diagnostizierten Anti-SSA positiven pSS?

Für beide Publikationen wurde auf Blutproben basierende Immunphänotypisierungen mittels Durchflusszytometer-Analysen, Isolierungen von Zellen und Stimulationsexperimenten durchgeführt und mit klinisch-serologischen Parametern korreliert und verglichen.

2. Methodik

2.1. Patient:innenkollektiv und Blutproben

Für die Publikation Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J et al. (2022) konnten insgesamt 30 COVID-19 Patient:innen rekrutiert werden (11). Diese ließen sich unterteilen in milde COVID-19-Erkrankte (n=17), welche nicht hospitalisiert werden mussten und schwere COVID-19-Erkrankte (n=13), welche auf der Intensivstation behandelt wurden. Von den 13 Patient:innen mit schweren Verläufen verstarben 6 Patient:innen aufgrund der COVID-19 Erkrankung. Zusätzlich wurden 20 gesunde Kontrollen analysiert. Alle Teilnehmer:innen oder deren gesetzlichen Vertreter:innen gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Nummer der ethischen Genehmigung EA2/066/20 Pa-Covid-19) genehmigt.

Tabelle 1: Studienpopulation der Publikation Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J et al. (2022).

	Milde COVID-19 Erkrankte	Schwere COVID-19 Erkrankte	Gesunde Kontrolle
Anzahl (n)	17	13	20
Alter (median)	47,5	61	35
Geschlecht (w; m)	7w; 10m	1w; 12m	14w; 6m

Quelle: eigene Abbildung.

Für die Publikation Ritter J et al. (2024) konnten insgesamt 34 Patient:innen mit einem primären Sjögren Syndrom eingeschlossen werden (5). Alle pSS Patient:innen erfüllten die ACR/EULAR-Kriterien (25). Die pSS Patient:innen konnten weiterhin entsprechend der klinischen Manifestationen in zwei Untergruppen unterteilt werden. Eine Gruppe wies eine ausschließlich glanduläre (GL) Symptomatik (Sicca-Symptome) auf. Die andere Gruppe wies zusätzlich systemische/extraglanduläre (EGL) Manifestationen (z.B. Arthritis, Nephritis) auf. Die Krankheitsaktivität wurde mit dem *European Sjögren Syndrome Disease Activity Index* (ESSDAI) gemessen (39). Die Kohorte umfasste 13 Patient:innen mit glandulären Manifestationen mit einem mittleren ESSDAI von 3,0 und 21 Patient:innen mit extraglandulären Manifestationen mit einem mittleren ESSDAI von 7,23.

Alle Teilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis, und die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin (Nummer der ethischen Genehmigung EA4/051/17) in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki genehmigt.

Tabelle 2: Studienpopulation der Publikation Ritter J et al. (2024).

	gesamte pSS Kohorte	pSS Subgruppen	
		Glandulär	Extraglandulär
Anzahl (n)	34	13	21
Alter (Ø, Range)	57 (31-85)	62,2 (36-82)	52,1 (31-85)
Geschlecht (w; m)	32w; 2m	13w; 0m	19w; 2m
ESSDAI (Ø)	5,1	3	7,2

Quelle: eigene Abbildung.

2.2. Immunphänotypisierung im peripheren Blut

Von allen Patient:innen wurden periphere Blutproben (EDTA antikoaguliert, BD Vacutainersystem, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) und Serumproben (BD Vacutainersystem, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) gesammelt und diese für die intrazelluläre Färbung und durchflusszytometrische Messung vorbereitet. Dafür erfolgte die Erythrolyse und Fixierung von 500µl frischen Vollblutes unmittelbar nach der Blutentnahme mit *BD Phosflow Lyse/Fix Buffer* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) für 10 min bei 37°C. Nach zwei Waschschrritten mit kaltem *PBS/0,5% BSA/EDTA* (autoMACS Rinsing solution/MACS BSA stock solution, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Germany, Zentrifuge: 310g, 5 min, 4°C) erfolgte die Permeabilisierung mittels *BD Perm Buffer II* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA; 12h, -20°C) und die anschließende Lagerung über Nacht bei -20°C.

Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut zweimal mit *PBS/0,5% BSA/EDTA* (PBE) gewaschen und in *Brilliant Buffer* (BD Horizon, San Jose, CA, USA) re-suspendiert. Nach der Inkubation mit *FcR-Blockierungsreagenz* (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, NRW, Deutschland) erfolgte die Färbung mittels Fluorochrom markierter Antikörper.

Für die IRF9- und STAT2-Analyse wurden die Zellen 30 Minuten lang entweder mit einem unkonjugierten rabbit-IRF9-Antikörper (Thermo Fisher, Isotyp rabbit-IgG, Klon 14H9L22, 1:100) oder einem unkonjugierten rabbit-STAT2-Antikörper (Cell Signaling, Isotyp rabbit-

IgG, Klon D9J7L) inkubiert. Nach 30 min wurden die Zellen gewaschen und mit einem sekundären Antikörper (AF488, donkey-anti-rabbit-IgG, Jackson Immuno Research, Isotyp donkey-anti-rabbit-IgG, polyklonal, 1:100) inkubiert und weitere 30 Minuten gefärbt. Alle anderen Fluorochrom markierten Antikörper wurden für eine Stunde inkubiert und dann mit *PBS/0,5% BSA/EDTA* (PBE) gewaschen.

2.2.1. Antikörperliste

Tabelle 3 und 4 stellen die Antikörperlisten für relevante Expressionsmoleküle für zwei verschiedene Zell-Phänotypisierungen dar.

Tabelle 3 mit CXCR5, CD38, CD11c, CD24 und CD10 beinhaltet eine besonders detaillierte B-Zell-Phänotypisierung, während Tabelle 4 eine Färbung mit weiteren T-Zell spezifischen Markern (CD3, CD4, CD8) aufführt.

Tabelle 5 enthält die Antikörperliste mit den untersuchten Molekülen des Interferonsignalweges.

Tabelle 3: Antikörperliste mit Fluorochrom und Volumen zur genauen Immunphänotypisierung von B-Zellsubpopulationen.

B-Zell Färbung		
<i>Antikörper</i>	<i>Fluorochrom</i>	<i>Volumen</i>
CD11c	BU737	1µl
CD14 CD3	BUV395	1µl
CD27	BV785	2µl
CD19	BV711	2,5µl
CD24	BV605	1µl
CD10	BV510	5µl
CXCR5	BV421	5µl
CD95	PE-Cy7	0,5µl
IgD	PE-CF594	0,1µl
CD38	APC-Cy7	0,1µl

Quelle: eigene Darstellung.

Tabelle 4: Antikörperliste mit Fluorochrom und Volumen zur Immunphänotypisierung von T- und B-Zellsubpopulationen.

T- und B-Zell Färbung		
<i>Antikörper</i>	<i>Fluorochrom</i>	<i>Volumen</i>
CD14	BUV395	1µl
CD3	PE-Cy7	0,5µl
CD4	BV510	1µl
CD8	BUV737	0,1µl
CD19	BV711	2,5µl
CD27	BV786	2µl
IgD	PE-CF594	0,1µl

Quelle: eigene Darstellung.

Tabelle 5: Signalmoleküle des Interferonsignalweges.

Signalmoleküle des Interferonsignalweges		
<i>Antikörper</i>	<i>Fluorochrom</i>	<i>Volumen</i>
STAT1	PE	5µl
STAT2	unkonjugiert	0,5µl
IRF9	unkonjugiert	0,5µl
IRF1	PE	2,5µl
pIRF7	APC/AF647	5µl
pSTAT1 Serin 727	APC	2µl
pSTAT1 Tyrosin 701	FITC	7,5µl
pSTAT2 Tyrosin 690	AF647	10µl
Sekundär Antikörper	FITC/AF488	0,128µl

Quelle: eigene Darstellung.

2.2.2. Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit einem BD FACS LSR Fortessa X-20 (BD Bio-sciences, Franklin Lakes, NJ, USA) Durchflusszytometer durchgeführt. Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (Median Fluorescence Intensity, MFI) der verschiedenen Marker. Um technisch stabile Untersuchungsbedingungen zu garantieren, wurden *Cytometer Setup and Tracking Beads* (CST Beads, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), sowie *Rainbow Calibration Particles* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurde zu jeder gemessenen Patient:innenprobe mindestens auch eine gesunde Kontrollprobe gemessen, um möglichst vergleichbare Bedingungen in allen Messkohorten zu erhalten.

2.2.3. T- und B-Zellsubpopulationen

Zunächst wurden Lymphozyten mittels *Forward versus Side scatter Plot* (FSC vs. SSC) anhand der Größe und Granularität (Komplexität) identifiziert. Als Nächstes folgte der Ausschluss möglicher Dubletten mittels *FSC-H* (H, Height) vs. *FSC-A* (A, Area) Plot um nur *Single cells* weiter zu untersuchen. Danach folgte die Aufteilung in CD3⁺ T Zellen und CD19⁺ B Zellen.

Die T-Zellsubpopulationen wurden wie folgt identifiziert: CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD4⁺); CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD8⁺); CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) und CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ doppelt negative (DN) T-Zellen (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻). (Gating-Strategie in **Abb. 1B**).

Die B-Zellsubpopulationen wurden wie folgt identifiziert: naive- (CD19⁺ CD20⁺ CD27⁻ IgD⁺); pre-switched memory- (psw; CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgD⁺); conventional memory- (mem; CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgD⁻); doppelt negative- (DN; CD19⁺ CD20⁺ CD27⁻ IgD⁻) B-Zellen und Plasmablasten (PB; CD19⁺ CD20^{low} CD27⁺⁺).

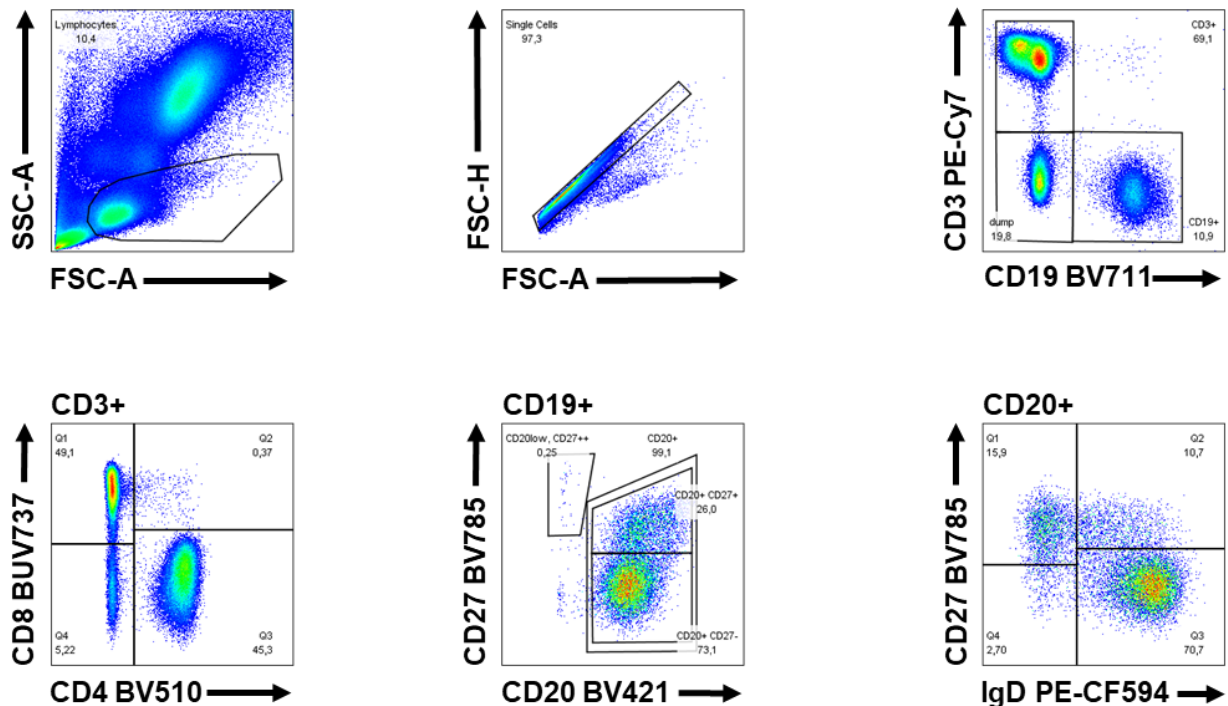


Abbildung 3: Gating-Strategie der Durchflusszytometrie.

Mittels *FSC* vs. *SSC* und *FSC-H* vs. *FSC-A* werden Lymphozyten isoliert und Doubletten ausgeschlossen. Danach folgt die Aufteilung in $CD3^+$ T Zellen und $CD19^+$ B Zellen. $CD3^+$ T-Zellen können weiterunterteilt werden: $CD3^+ CD4^+$ T-Zellen ($CD3^+ CD4^+$); $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen ($CD3^+ CD8^+$); $CD3^+ CD4^+ CD8^+$ T-Zellen ($CD3^+ CD4^+ CD8^+$) und $CD3^+ CD4^- CD8^-$ doppelt negative T-Zellen ($CD3^+ CD4^- CD8^-$). $CD19^+$ B-Zellen können weiterunterteilt werden: naive- ($CD19^+ CD20^+ CD27^- IgD^+$); pre-switched memory (psw; $CD19^+ CD20^+ CD27^+ IgD^+$); conventional memory- (mem; $CD19^+ CD20^+ CD27^+ IgD^-$); doppelt negative- (DN; $CD19^+ CD20^+ CD27^- IgD^-$) B-Zellen und Plasmablasten (PB; $CD19^+ CD20^{low} CD27^{++}$). Quelle: modifizierte Abbildung aus Ritter et al., 2024 (5).

2.3. Siglec-1 Expression auf $CD14^+$ Monozyten

Zur Bestimmung von Siglec-1 (CD169) wurden 200 μ l frisches Vollblut mit 2 ml *BD Pharm Lyse* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) für 15 min lysiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 3 ml *PBS/0,5% BSA/EDTA* (autoMACS Rinsing solution/MACS BSA stock solution, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Germany, Zentrifuge: 310g, 5 min, 4°C). Danach wurde mittels *FcR-Blockierungsreagenz* (Miltenyi Biotec, Bergisch

Gladbach, NRW, Germany) für 5 min bei Raumtemperatur (RT) eine unspezifische Bindung zu IgG-Fc-Rezeptoren verhindert. Nachfolgend wurde die Immunphänotypisierung durchgeführt und folgende Antikörper für 15 min bei 4°C genutzt: Anti-CD3-PB, Anti-CD19-PECy7, Anti-CD20-BV510, Anti-CD27-FITC, Anti-CD14-APCH7 und Anti-Siglec-1-APC. Es folgte ein letzter Waschschrift mit 3 ml *PBS/0,5% BSA/EDTA*. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung erfolgte die Zugabe von *DAPI* (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 1 µl von 300nM). Die Messung erfolgte an dem Durchflusszytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.4. Gewinnung von PBMCs mittels Ficoll-Lösungen

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMCs) wurden aus Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation mittels *Ficoll-Paque PLUS* (GE Healthcare Bio-Sciences, Chicago, IL, USA) gewonnen. Dafür wurde EDTA-Vollblut mit *PBS* verdünnt und über *Ficoll Paque PLUS* geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugierung für 20 Minuten mit 1800 rpm ohne Bremse. Gefolgt von zwei Waschschriften (1400 rpm, 10 min, RT) wird die Zellzahl mittels Horiba ABX Micros 60 (Horiba, Kyoto, Japan) bestimmt. *Abbildung 4* zeigt die schematische Isolierung von PBMC Zellen aus Vollblut und die Auftrennung nach der Zentrifugation.

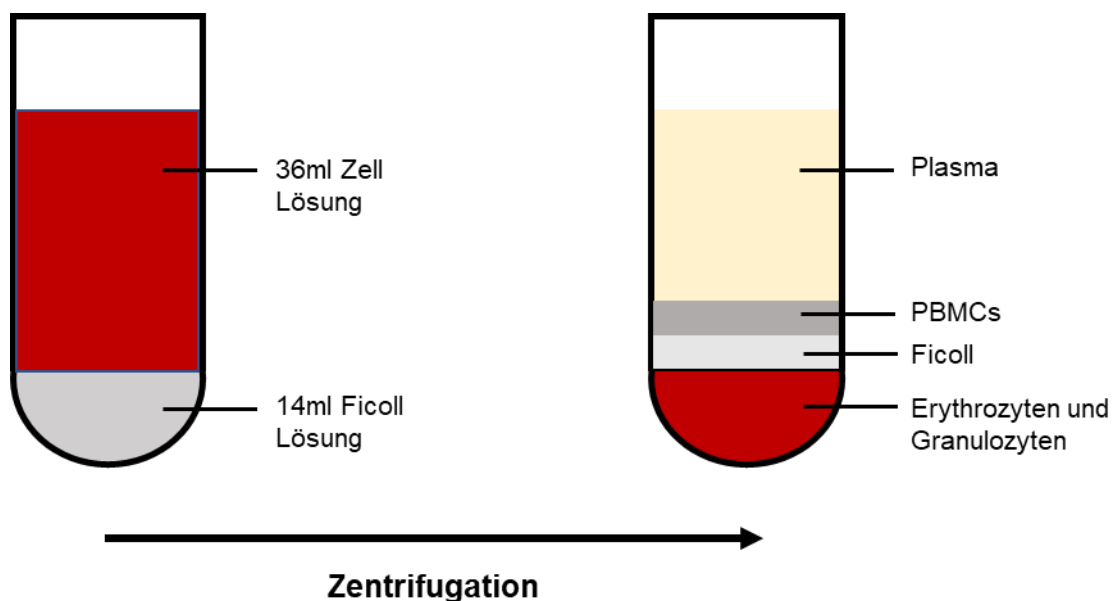


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gewinnung von PBMC Zellen aus Vollblut.

Quelle: eigene Abbildung.

2.5. Funktionelle Analysen durch IFN α und IFN γ Stimulationsexperimente

Zur weiteren Untersuchung der relevanten Phosphorylierungsstellen von STAT1 (pSTAT1 Tyrosin 701) und STAT2 (pSTAT2 Tyrosin 690) Molekülen wurden Stimulationsexperimente mit IFN α und IFN γ durchgeführt und die Zellen für 30 min und für 48h stimuliert.

2.5.1. Kurzzeitstimulation

Insgesamt wurden die isolierten PBMCs (1 Mio. Zellen) in 100 μ l *RPMI Medium* (GlutaMAX, Life Technologies, Paisley, UK) überführt und mit IFN- α 2a (100 ng/mL) (rekombinant human, Miltenyi) oder IFN- γ 1b (100 ng/mL) (rekombinant human, Miltenyi) für jeden Zeitpunkt separat stimuliert. Die Stimulation wurde nach 2, 5, 8, 15 und 30 Minuten durch Fixierung gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen geerntet, gewaschen, lysiert, permeabilisiert und mit dem oben beschriebenen Protokoll und Färbungen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.2. 48h Langzeitstimulation

Die Langzeitstimulation erfolgte mittels Zellkultur, bei der *Medium* (RPMI, 10% Fetal Bovine Serum und 1% Penicillin/Streptomycin, Gibco by lifetechnologies/Thermo Fisher, Paisley, Scotland) mit IFN α oder IFN γ (jeweils 5 ng/ml) genutzt wurden und für 48 Stunden stimuliert wurden. Nach 48 Stunden wurden die Zellen dann geerntet, gewaschen und wie oben beschrieben analysiert.

2.6. Statistik

Die erhobenen Daten der Durchflusszytometrie wurden mittels *FACSDiva-Software* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) und *FlowJo-Software* (Version 10.6.1, TreeStar, Ashland, OR, USA) ausgewertet. Die graphische und statistische Datenanalyse erfolgte mit *GraphPad Prism* (Version 9.00, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und R (Version), einschließlich des *Corrplot-Pakets* (R Foundation for Statistical Computing, Version).

Die statistische Signifikanz zwischen zwei stetigen, nicht-gepaarten, nicht-normalverteilten Variablen/Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test (MWU) und für zwei gepaarte Gruppen mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. Für die Analyse von mehr als zwei Gruppen (Mehrfachvergleiche) wurde der *One-Way ANOVA* Test (Kruskal-Wallis Test) gefolgt vom post-hoc mehrfach vergleichenden Dunn's Test verwendet. Korrelationsanalysen wurden mittels Spearman-Korrelationskoeffizient durchgeführt. Korrelationsmatrizen wurden mittels R und *corrplot package* berechnet und visualisiert. Zur Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und der Cut-off Werte für STAT1 Biomarker wurden *Receiver-Operating-Characteristics* (ROC)-Kurven erstellt. Die Fläche unter der Kurve (*area under the curve* (AUC)) wurde errechnet und statistisch signifikante Unterschiede werden angegeben.

Wenn nicht anders angegeben, stellen die Streuungs- und Balkendiagramme Mittelwerte mit der Standardabweichung (SD) dar. Als statistisch signifikant werden p-Werte $\leq 0,05$ gewertet und sind in den Abbildungen wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3. Ergebnisse

3.1. Erhöhte Interferon Signalmoleküle in COVID-19 Erkrankten

Interferone sind von wesentlicher Bedeutung in der antiviralen Immunabwehr des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Ca. 10% der schweren COVID-19-Erkrankten wiesen neutralisierende Autoantikörper gegen IFN α und/oder IFN- γ auf, während diese in mild oder asymptomatisch Erkrankten nicht nachweisbar waren (10). Das fehlende IFN lässt auf eine gestörte antivirale Abwehr schließen, welche sich in klinisch schwereren Verläufen widerspiegelt.

In der Publikation von Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J et al. (2022) wurde der Interferon induzierten JAK/STAT Signalweg in T- und B-Zellsubpopulationen von SARS-CoV-2 Infizierten untersucht und mit den Krankheitscharakteristika assoziiert (**Abb.5**) (11). Es fanden sich signifikant erhöhte STAT1 Moleküle in allen T- und B-Zellsubpopulationen von mild und schwer COVID-19 Erkrankten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (**Abb. 5A** und **5B**). Interessanterweise zeigten schwere COVID-19 Verläufe eine Tendenz zu niedrigeren IFN-Signalwegmolekülen im Vergleich zu leichteren Verläufen (**Abb. 5A, 5B**). In der Publikation wurde dies zusätzlich für STAT2 und IRF9 dargestellt (11).

Die Höhe der IFN-Signalmoleküle (u.a. STAT1) korrelierte mit Siglec-1, einen Typ I IFN Signatur Marker gemessen auf CD14⁺ Monozyten (****p=0,0001; r=0,7493; Spearman Korrelation) (**Abb.5C**).

Um eine chronische IFN-Exposition auf den Signalweg in T- und B-Zellen zu simulieren, wurden PBMCs 48 Stunden mit IFN α oder IFN γ stimuliert. **Abbildung 5D** zeigt die 48h IFN-Stimulation in den verschiedenen Kohorten. Bemerkenswert ist die deutlich signifikante Erhöhung von STAT1 Protein bei Gesunden (IFN α ** p< 0,01; IFN γ *** p< 0,001) und bei mild COVID-19 Erkrankten nach 48 h IFN-Stimulation, welche bei schweren COVID-19 Erkrankten weniger prägnant ausfiel (**Abb.5D**).

Insgesamt zeigt die Publikation einen aktivierten IFN-Signalweg in T- und B-Zellsubpopulationen, welcher in schweren COVID-19 Verläufen gestört scheint (11).

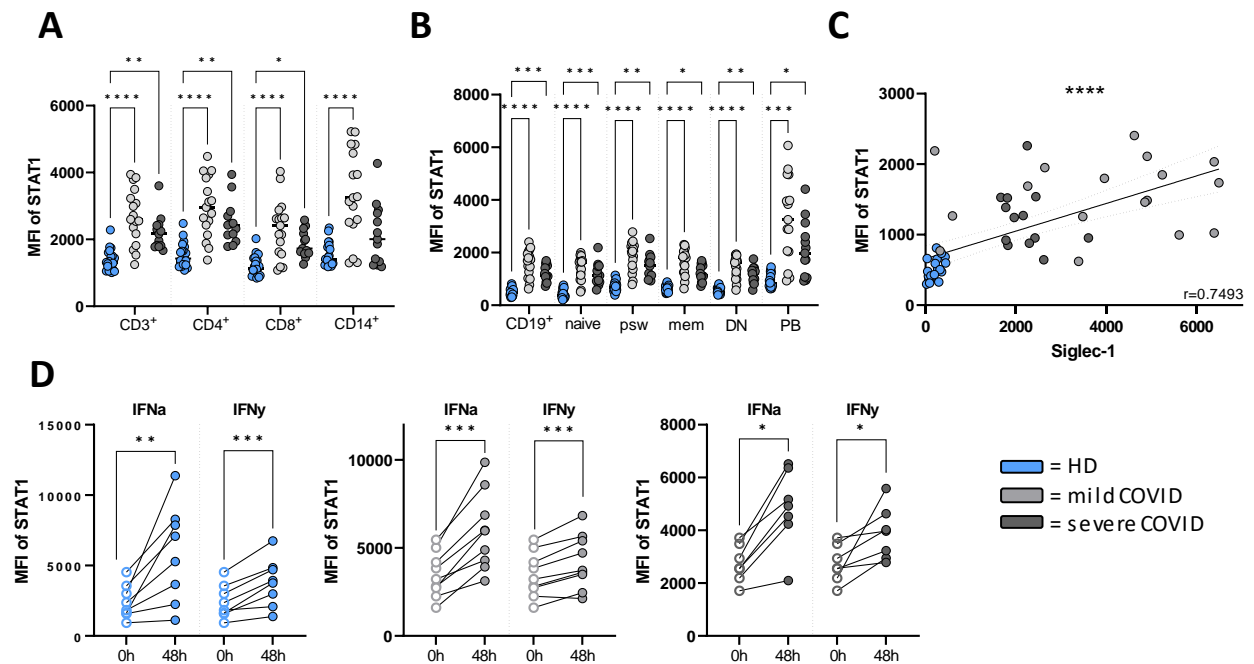


Abbildung 5: Erhöhte STAT1 Werte bei COVID 19 Erkrankten und in Gesunden durch Langzeitstimulation mit Interferon.

(A) Expression von STAT1 in CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T Zellen, CD14⁺ Monozyten **(B)** und in CD19⁺, naiven- (naive, CD27⁻, IgD⁺), psw-Gedächtnis (psw, CD27⁺ IgD⁺), Gedächtnis- (mem, CD27⁺ IgD⁻), doppelt negativen- (DN, CD27⁻ IgD⁻) B Zellen und Plasmablasten (PB, CD20^{low} CD27⁺⁺). **(C)** Spearman-Korrelation von STAT1 in CD19⁺ B Zellen mit Siglec-1 auf CD14⁺ Monozyten. **(D)** STAT1 in CD19⁺ B-Zellen nach 48h Langzeitstimulation mit Interferon (IFN) alpha und gamma in gesunden Kontrollen, milden und schweren COVID-19 Erkrankten. Gesunde Kontrolle (HD) in blau; mild COVID-19-Erkrankte in hellgrau; schwere COVID-19-Erkrankte in dunkelgrau. In Abb.5A, 5B wurde die statistische Signifikanz mit einem One-Way ANOVA Test (Kruskal-Wallis Test) ermittelt. Abb.5C Spearman-Korrelation. Abb.5D Wilcoxon Rank Test. Statistisch signifikant nach *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,0001. Quelle: modifizierte Abbildung aus Rincon, Aue, Ritter et al., 2022 (11).

3.2. STAT1 Werte im Verlauf nach SARS-CoV-2 mRNA Vakzinierung

Im Zuge der COVID-19 Pandemie kamen auch erstmalig mRNA basierte Vakzinierungen zum Einsatz. Die Translation von SARS-CoV-2 mRNA in antigenpräsentierenden Zellen

führt zur Präsentation von Proteinbruchstücken auf MHC-I und MHC-II Komplexen. Dies löst in der Folge eine zelluläre und humorale Immunantwort aus. Der B-Zell-Rezeptor erkennt das passende MHC II Peptid und es kommt daraufhin zu einer Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, in dessen Folge spezifische Antikörper gebildet werden. Wir konnten erstmalig den intrazellulären IFN-Signalweg in T- und B-Zellsubpopulationen nach mRNA-Vakzinierungen in einem Follow-up untersuchen. Blutproben wurden an Tag 0, 7, 14 und 21 nach der ersten Impfung und am Tag 7 nach der zweiten Impfung (Boost, Tag 28) analysiert. Insbesondere am Tag 7 nach der zweiten Impfung (Tag 28) zeigte sich ein deutlicher Anstieg von STAT1 in T- und B Zellsubpopulationen (**Abb.6A, 6C**). Dieser Anstieg fand sich auch bei IRF9 in T- und B Zellsubpopulationen nach der zweiten Impfung (**Abb.6B, 6D**).

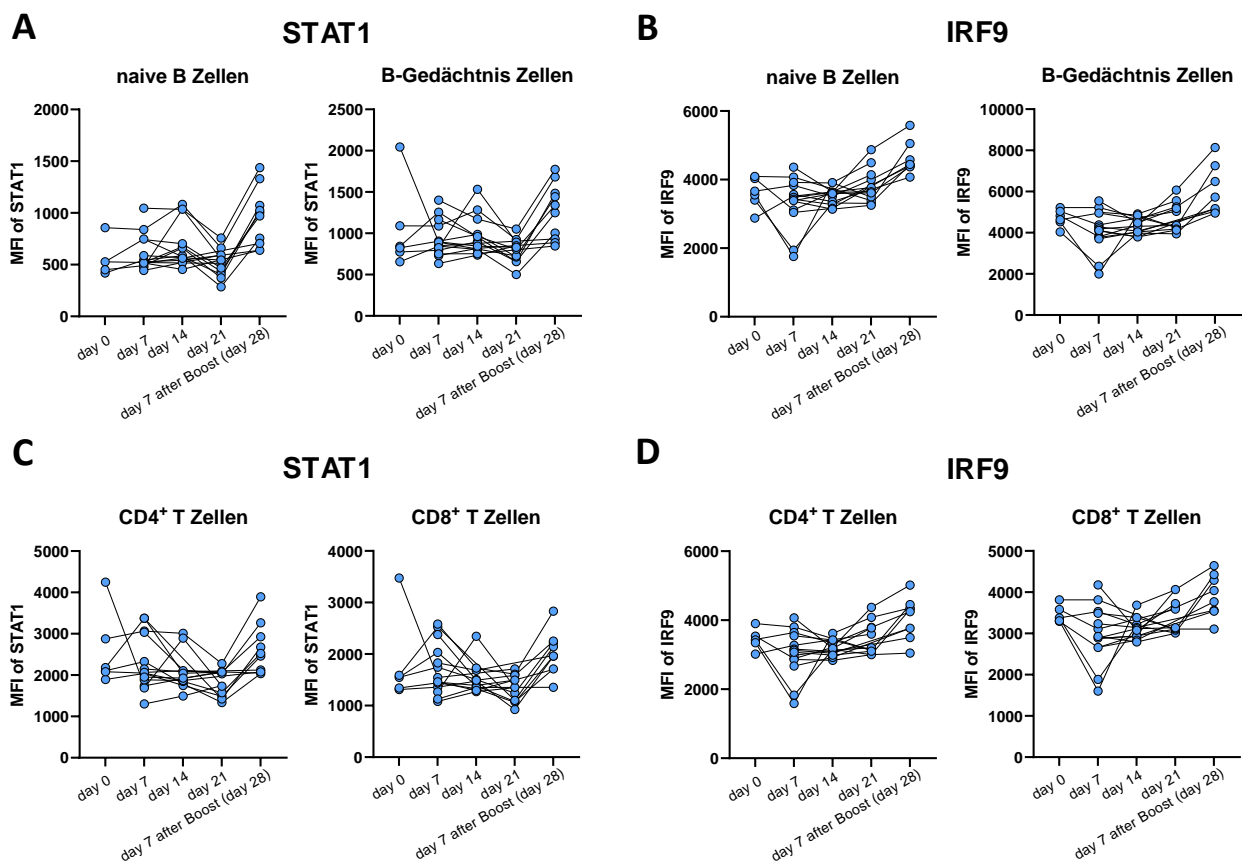


Abbildung 6: STAT1 Werte im Follow-up nach Vakzinierung in T- und B Zellen.

(A) Expression von STAT1 und (B) IRF9 in naiven- (naive, CD27⁻, IgD⁺) und Gedächtnis- (mem, CD27⁺ IgD⁻) B Zellen. (C) Expression von STAT1 und (D) IRF9 in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an Tag 0, 7, 14 und 21 nach der ersten Impfung und am Tag 7 (Tag 28 nach erster Impfung) nach der zweiten Impfung in gesunden Kontrollen. Quelle: eigene Abbildung.

3.3. Erhöhte STAT1 Werte bei Anti-SSA positiven, klinisch asymptomatischen Frauen mit einem erhöhten Risiko für einen kongenitalen Herzblock

Neben der physiologischen Funktion von Interferonen in der viralen Immunabwehr haben Interferone auch eine Bedeutung in verschiedenen pathologischen Autoimmunprozessen. Ein Beispiel dafür sind gesunde Frauen, die Träger von Anti-SSA Autoantikörpern sind. Diese können während einer Schwangerschaft über die Plazenta an das ungeborene Kind weitergegeben werden und dort einen kongenitalen Herzblock auslösen. Als weiterer Risikofaktor gilt eine erhöhte Interferonsignatur (36).

Es konnten vorliegend 21 gesunde Frauen, 7 Anti-SSA+ gesunde Frauen („at-risk“) und 11 Anti-SSA+ Sjögren Syndrom Patientinnen eingeschlossen werden. Von den 7 „at-risk“ Frauen hatten drei Frauen eine Schwangerschaft mit einem kongenitalen Herzblock.

Insgesamt wiesen „at-risk“ Frauen im Vergleich zur gesunden Kontrolle signifikant erhöhte STAT1 Werte in allen untersuchten B-Zell-Subpopulationen auf (**Abb.7A**). Während sich zwischen pSS-Patientinnen und „at-risk“ Frauen lediglich ein leichter Trend zu erhöhten STAT1 Werten in pSS-Patientinnen und kein statistisch signifikanter Unterschied fand (**Abb.7A**).

In einem nächsten Schritt wurde die B-Zellverteilung untersucht. Beim pSS sind erhöhte naive B-Zell Frequenzen und erniedrigte Frequenzen von pre-switched- und switched-memory B Zellen beschrieben worden (29). Daten zu asymptomatischen Frauen mit positiven Anti-SSA Autoantikörpern („at-risk“) fehlen. Somit konnte erstmalig ein Einblick in die Verteilung von B-Zellsubpopulationen in „at-risk“ Frauen erlangt werden. Insgesamt verteilten sich die B-Zellsubpopulationen in „at-risk“ Frauen ähnlich zu denen von gesunden Kontrollen (**Abb.7B, 7C**). Die Frequenz von naiven B Zellen war erniedrigt in gesunden Kontrollen und „at-risk“ Frauen im Vergleich zu pSS-Patientinnen. Dagegen fand sich eine erhöhte Anzahl an pre-switched-memory- und switched-memory-B-Zellen im Vergleich zu pSS Patientinnen. Interessanterweise war die Frequenz von Plasmablasten in pSS und in „at-risk“ Frauen signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen (**Abb.7B, 7C**).

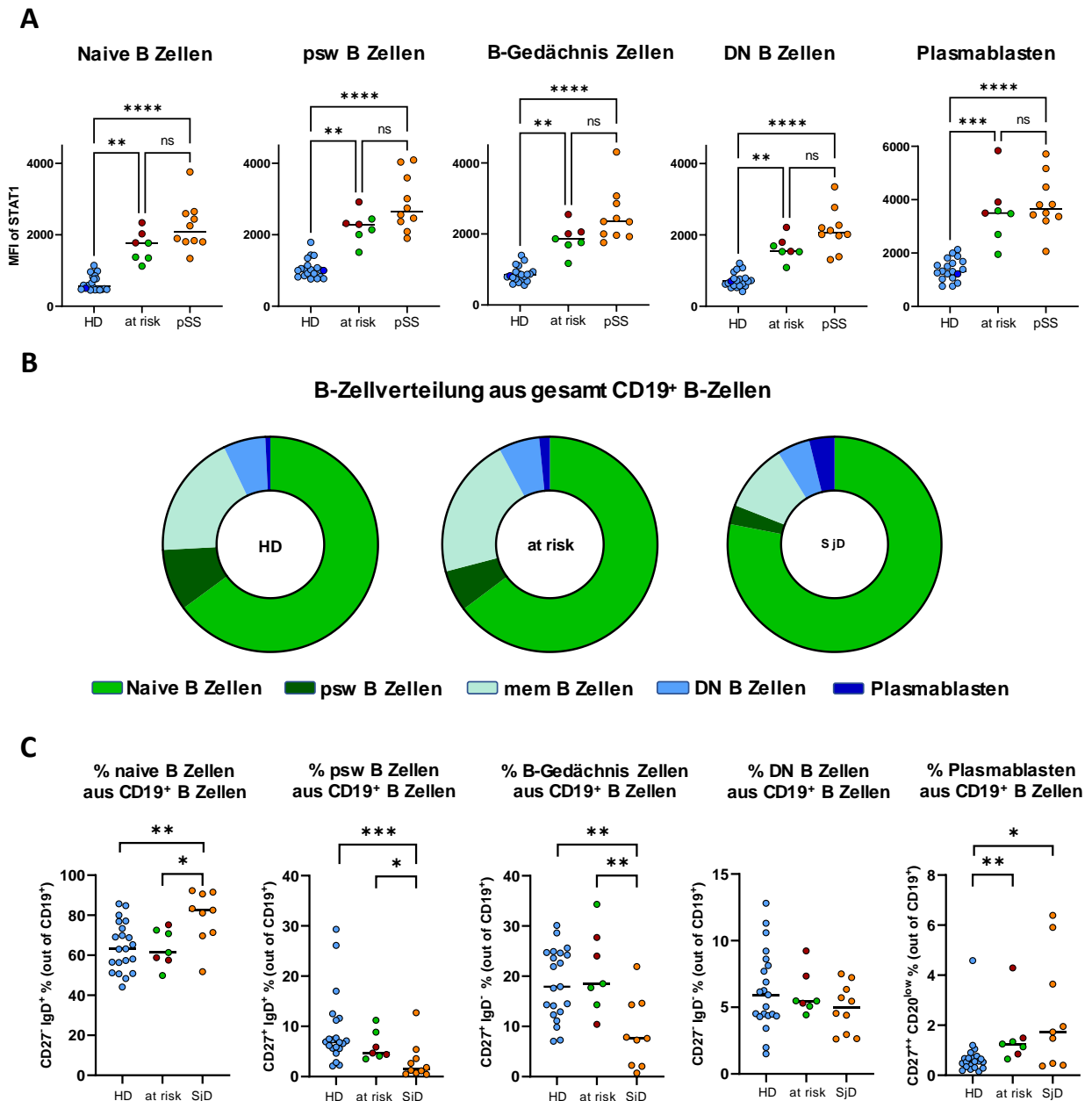


Abbildung 7: IFN-Signalmoleküle und die Verteilung von B-Zellsubpopulationen in gesunden Anti-SSA positiven Frauen mit einem erhöhten Risiko für einen kindlichen Herzblock.

(A) Expression von STAT1 in naiven- (naive, CD27⁻, IgD⁺), psw-Gedächtnis- (psw, CD27⁺ IgD⁺), Gedächtnis- (mem, CD27⁺ IgD⁻), doppelt negative- (DN, CD27⁻ IgD⁻) B Zellen und Plasmablasten (PB, CD20^{low} CD27⁺). (B) Der prozentuale Anteil von naiven-, psw-Gedächtnis-, Gedächtnis-, DN-B Zellen und Plasmablasten an CD19⁺ B-Zellen für Gesunde, Anti-SSA positive Frauen (at-risk) und pSS Patientinnen als Tortendiagramm und (C) als Streudiagramm mit statistischer Signifikanz. Gesunde Kontrollen (HD) in blau, gesunde

Anti-SSA positive Frauen („at-risk“) in Grün und Schwangerschaften mit einem kindlichen kongenitalen Herzblock in Rot, Sjögren Syndrom Patientinnen (pSS/SjD) in Orange. In Abb.7A, 7C One-Way ANOVA Test (Kruskal-Wallis Test). Statistisch signifikant nach * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Quelle: eigene Abbildung.

3.4. Jak/STAT Signalweg in T- und B Zellsubpopulationen im primären Sjögren Syndrom

Das primäre Sjögren Syndrom ist eine Autoimmunerkrankung, bei der die Aktivierung von B-Zellen und Interferone die Hauptmerkmale in der Pathogenese bilden (28, 31).

Insgesamt zeigten sich in fast allen T- und B-Zellsubpopulationen signifikant erhöhte Werte von STAT1, STAT2 und IRF9 Proteinen in pSS Patient:innen (**Abb.8A-C**).

Zusätzlich wurden die Phosphorylierungsstellen pSTAT1 Y701 und pSTAT2 Y690 untersucht. Nur pSTAT1 (Y701) in den naiven B-Zellen sowie in CD4⁻, CD8⁻ und CD4⁺ CD8⁺ T-Zellen von pSS Patient:innen war im Vergleich zur gesunden Kontrolle erhöht (**Abb.8D**). Da gesteigerte Ausgangswerte für STAT1/2-Moleküle, aber keine eindeutigen Unterschiede in den Phosphorylierungsstellen festgestellt werden konnten, wurde die Ratio von pSTAT/STAT-Molekülen errechnet, um das Verhältnis zwischen den Werten von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein besser zu verstehen. Es fand sich ein signifikant verringertes Verhältnis von pSTAT1/STAT1 in allen B-Zellsubpopulationen sowie in CD4⁻ und CD4⁺ CD8⁺ T-Zellen bei pSS Patient:innen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (**Abb.8E**). Da die IFN-Signatur im pSS eine bedeutende Rolle spielt und man daher von einer chronischen IFN-Exposition bei pSS Patient:innen ausgehen kann, wurde die (erhaltene) Reaktionsfähigkeit der STAT1-Phosphorylierung nach IFN α - und IFN γ -Kurzzeit-Stimulation untersucht. Nach kurzfristiger IFN α - und IFN γ -Stimulation kam es zu einem Anstieg von phosphoryliertem STAT1 (pSTAT1 Y701) in allen untersuchten B-Zellen von pSS Patient:innen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (**Abb.8F**), sodass von einer erhaltenen Reaktionsfähigkeit auszugehen ist.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine durch IFN chronische intrinsische Prägung und Aktivierung von T- und B-Zellsubpopulationen bei pSS Patient:innen hin (5).

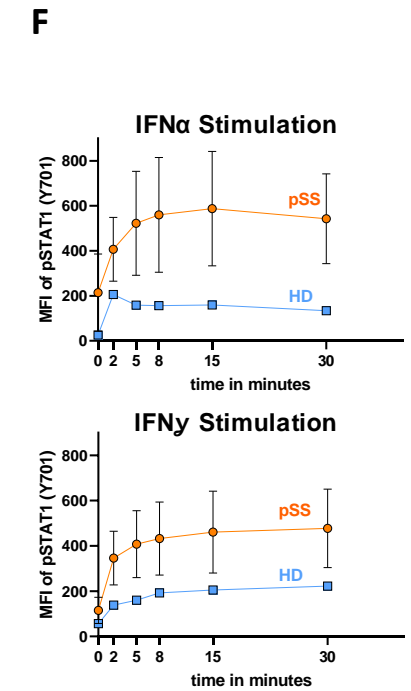
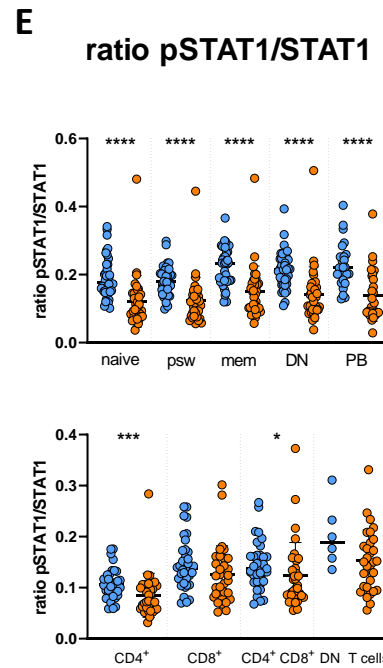
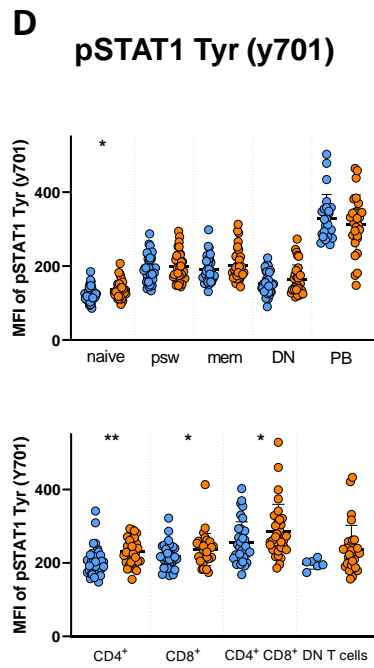
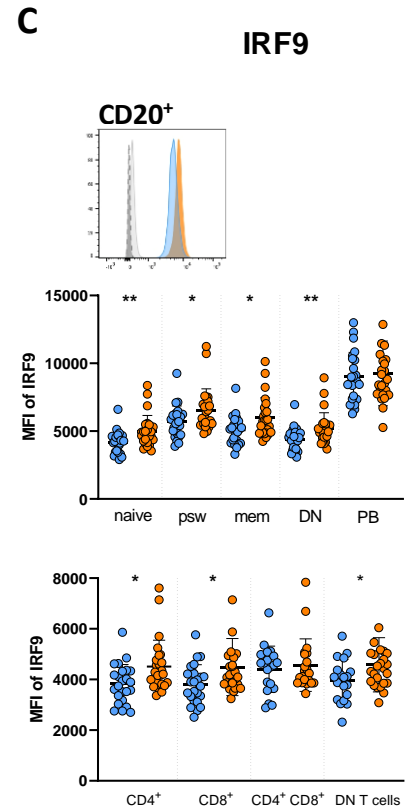
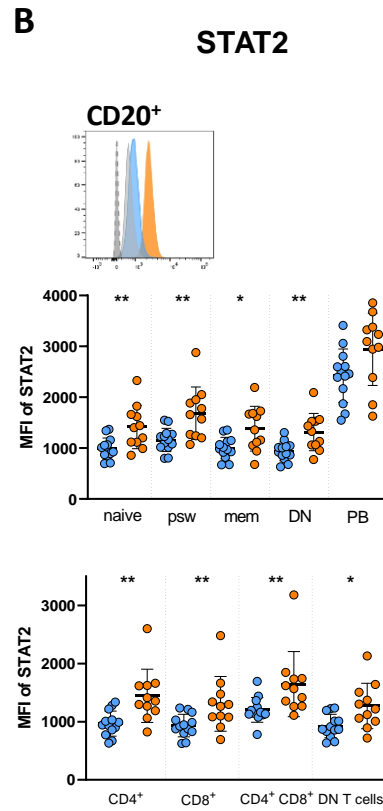
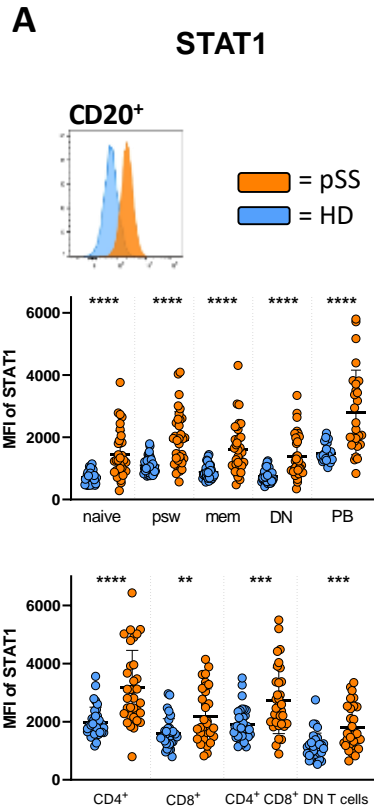


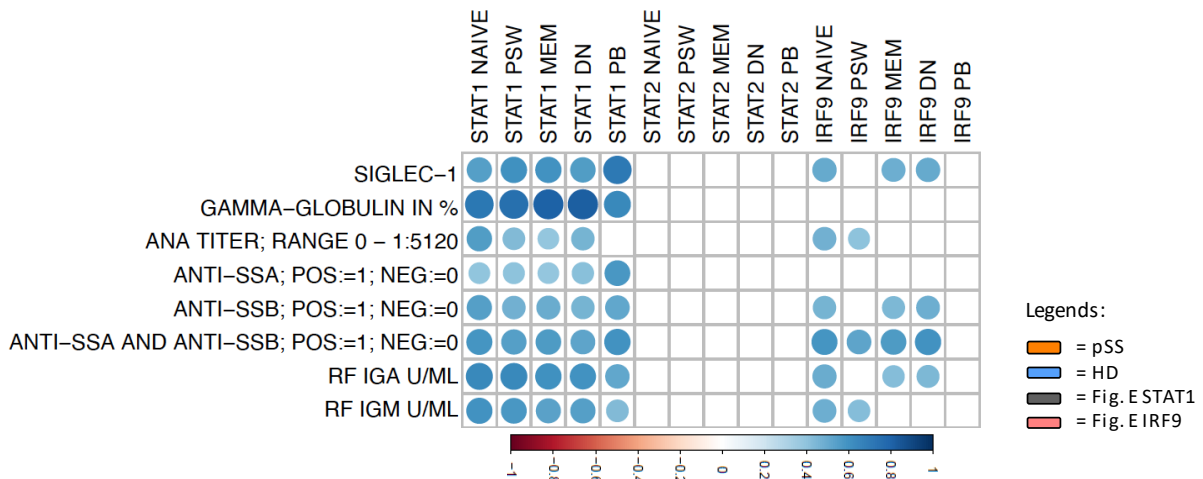
Abbildung 8: Erhöhte IFN-Signalwegmoleküle in T- und B Zellen im primären Sjögren Syndrom.

(A) Expression von STAT1 (B), STAT2 (C), IRF9 und (D) pSTAT1 Tyr (Y701) in naiven- (naive, CD27⁻, IgD⁺), psw-Gedächtnis- (psw, CD27⁺ IgD⁺), Gedächtnis- (mem, CD27⁺ IgD⁻), doppelt negative- (DN, CD27⁻ IgD⁻) B Zellen und Plasmablasten (PB, CD20^{low} CD27⁺⁺) und in CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺ CD8⁺ und doppelt negativen (DN) T Zellen. (E) Verhältnis von pSTAT1 (Y701) und STAT1 in T- und B-Zellen von Gesunden und pSS Patient:innen. (F) MFI von pSTAT1 (Y701) in naiven B-Zellen von HDs und pSS Patient:innen nach Kurzzeitstimulation mit IFN α und IFN γ . HDs in blau, n=38; pSS Patient:innen in orange, n=34; (für STAT2, n=11; für IRF9, n=24; für IFN-Stimulation: pSS n=5; HD n=2). In Abb. 8A sind repräsentative Histogramme der Moleküle (blaue/orange durchgezogene Linie), des FMO (gestrichelte Linie) und des sekundären Antikörpers (hellgraue durchgezogene Linie) abgebildet. Die Streudiagramme stellen Mittelwerte \pm SD dar; die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen MWU-Test (Mann Whitney U-Test) bestimmt *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001. Quelle: modifizierte Abbildung aus Ritter et al., 2024 (5).

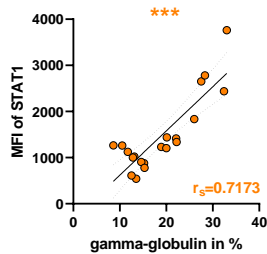
3.5. IFN-Signalmoleküle korrelieren mit der humoralen Autoimmunität

In einem nächsten Schritt wurde der Zusammenhang zwischen der Aktivierung des IFN-Signalweges in verschiedenen T- und B-Zellsubpopulationen und den charakteristischen serologischen Merkmalen (Gamma-Globuline, ANA-Titer, Anti-SSA und Anti-SSB Autoantikörper und Rheumafaktoren IgA und IgM) untersucht (5). Es fanden sich starke Korrelationen zwischen den serologischen Befunden und der STAT1- und IRF9 Expression in allen B-Zellsubpopulationen (**Abb. 9A**). Die Hypergammaglobulinämie im Serum korrelierte deutlich signifikant mit den STAT1-Spiegeln in allen B-Zellen (exemplarisch in naiven B Zellen p<0,0001; r= 0,7173) (**Abb. 9B**). Darüber hinaus zeigten pSS Patient:innen mit hohen ANA-Titern erhöhte STAT1-Spiegel (**** p<0,0001) (**Abb. 9C**). Patient:innen mit positiven Anti-SSA und Anti-SSB Autoantikörpern zeigten die höchsten STAT1 Werte in B-Zellen (**Abb.9D**) und die Titer des Rheumafaktors IgM korrelierten mit STAT1 (** p< 0,001; r=0,5930) und IRF9 (* p< 0,05; r= 0,4812) in naiven B Zellen (**Abb. 9E**).

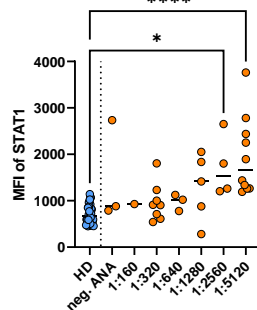
A



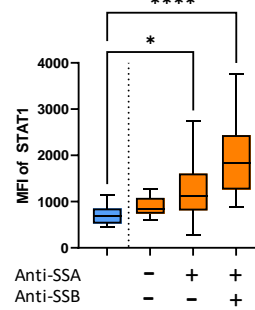
B



C



D



E

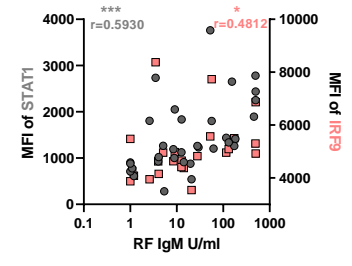


Abbildung 9: STAT1 und IRF9 Werte in B-Zellsubpopulationen korrelieren mit charakteristischen serologischen Autoimmunbefunden.

(A) Korrelationsmatrize der serologischen Merkmale (Siglec-1, Gammaglobulin in %, antinukleäre Antikörper (ANA), Anti-SSA- und Anti-SSB-Antikörper und Rheumafaktoren (RF) IgA/IgM mit STAT1, STAT2 und IRF9, in den verschiedenen B-Zellsubpopulationen im pSS. MFI von STAT1 in naiven B-Zellen (B) korreliert mit Gamma-Globulin (%), (C) exprimiert bei Patient:innen mit ANAs (ANA-Titer von HDs wurden nicht bestimmt, die STAT1-Werte dienen lediglich als Referenz.), (D) verteilt entsprechend dem Anti-SSA/Anti-SSB Status. (E) Korrelation von MFI STAT1 (grau, linke Achse) und IRF9 (rosa, rechte Achse) in naiven B Zellen mit IgM-Rheumafaktoren im pSS. Abb.8C und 8D stellen Mittelwerte \pm SD dar; die statistische Signifikanz wurde mit einem One-Way ANOVA Test (Kruskal-Wallis Test) ermittelt. Abb.9B und 9E Spearman-Korrelation. Abb. 9A Korrelationsmatrize mit Darstellung von Spearman rho (positive Korrelation = blau, inverse Korrelationen = rot), Größe und Intensität der Farbe beziehen sich auf die Stärke der Korrelation. Die statistische Signifikanz wird wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Quelle: modifizierte Abbildung aus Ritter et al., 2024 (5).

3.6. Monitoring von Subgruppen und Krankheitsaktivität im primären Sjögren Syndrom

Das primäre Sjögren Syndrom stellt eine klinisch heterogene chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung dar, die durch ein breites Spektrum an klinischen Manifestationen gekennzeichnet ist. Daher ist die Identifizierung neuer Biomarker erforderlich, um molekulare Merkmale von Untergruppen zu charakterisieren und somit die Durchführung von klinischen Studien und Subgruppenidentifizierungen zu verbessern.

Insgesamt konnten die 34 pSS Patient:innen in 13 mit glandulären (GL) und 21 mit einer systemischen/extraglandulären (EGL) Manifestation unterteilt werden (weitere Patient:innen-Charakteristika befinden sich detailliert in den Tabellen der Publikation (5)).

Die EGL-pSS Patient:innen wiesen deutlich erhöhte ESSDAI-Werte im Vergleich zu GL-pSS Patient:innen auf (EGL ESSDAI 7,23 vs. GL ESSDAI 3,0: *** $p < 0,001$) (**Abb.10A**).

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob sich die STAT1-Moleküle zwischen den verschiedenen klinischen pSS-Untergruppen (GL vs. EGL) unterscheiden. In allen B-Zell-Subpopulationen wiesen EGL-pSS Patient:innen signifikant erhöhte STAT1 Werte im Vergleich zu GL-pSS Patient:innen auf (exemplarisch in Plasmablasten GL vs. EGL ** $p < 0,01$ **Abb. 9B**).

Daher wurde in einem zweiten Schritt untersucht, ob sich STAT1 als Biomarker sinnvoll für die Unterteilung von pSS Subgruppen nutzen ließe. Zur Validierung wurden ROC-Kurven mit Cut-off-Werten und die *area under the curve* (AUC) errechnet (**Abb.9b**).

In den verschiedenen B-Zellen, insbesondere in Plasmablasten, konnte gezeigt werden, dass STAT1 Cut-off Werte als Biomarker zur Unterscheidung zwischen Gesunden, GL- und EGL-pSS Patient:innen genutzt werden können (**Abb.9b**; Unterscheidung zwischen GL- und EGL pSS Patient:innen: bei einem Grenzwert von STAT1 MFI von >2058 in Plasmablasten, mit einer Sensitivität von 87 %, Spezifität von 83 %, $AUC=0,84$).

In einem letzten Schritt wurden Korrelationen zwischen STAT/IRF-Molekülen und dem Krankheitsaktivitätsindex (ESSDAI) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass IRF9 in den meisten B- und in allen T-Zell-Subpopulationen mit dem ESSDAI korrelierte und daher als Biomarker für die Krankheitsaktivität verwendet werden könnte.

Zusammenfassend können die STAT1-Werte als Biomarker für die Identifizierung von pSS Subgruppen mit glandulärer und extraglandulärer Manifestation genutzt werden und IRF9 als Biomarker für die Krankheitsaktivität dienen (5).

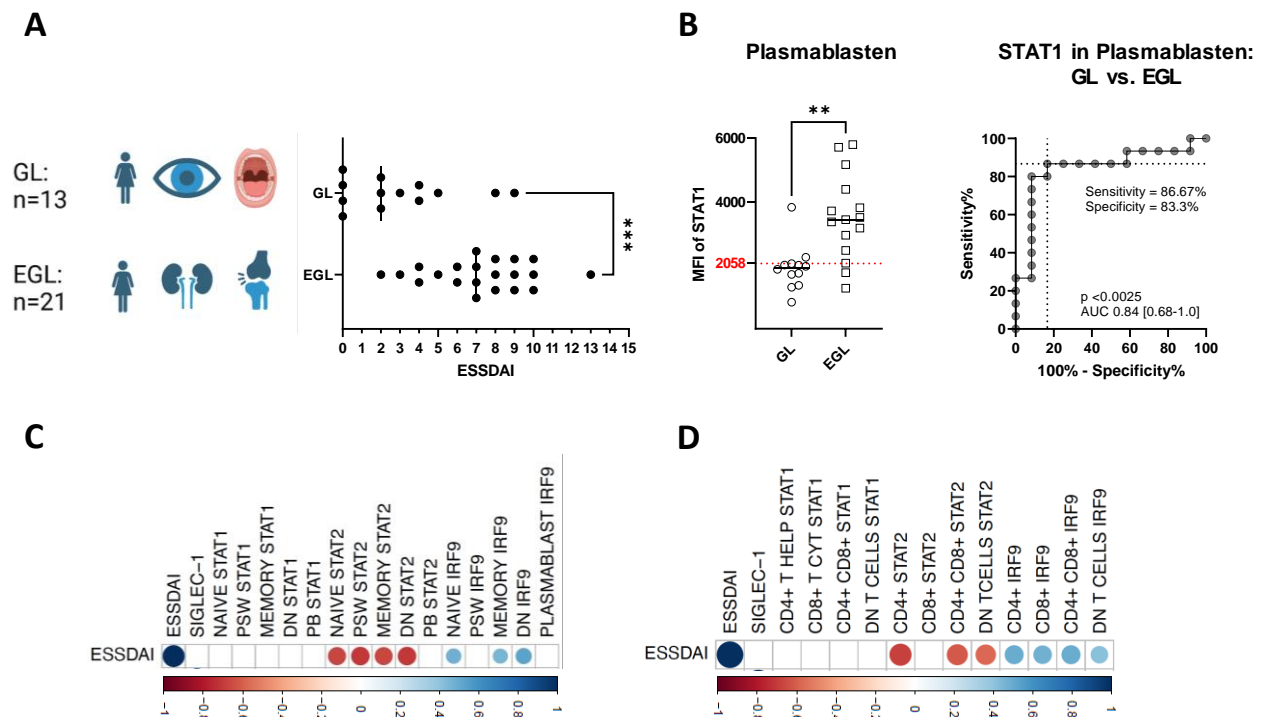


Abbildung 10: STAT1 als Biomarker zur Identifizierung von Subgruppen und IRF9 als Krankheitsaktivitätsmarker.

(A) Verteilung von 34 pSS Patient:innen nach glandulärer (GL) und extraglandulärer (EGL) Manifestation und Krankheitsaktivitätsindex (ESSDAI) von GL- und EGL-Patient:innen. (B) STAT1-Expression von GL- und EGL-pSS Patient:innen in Plasmablasten und Analyse einer ROC-Kurve mit Cut-off Werten der STAT1-Expression in Plasmablasten zur Vorhersage einer extraglandulären Manifestation. (C) Korrelationsmatrize mit STAT1, STAT2 und IRF9 in B-Zellsubpopulationen und (D) in T-Zellsubpopulationen von pSS Patient:innen und deren Krankheitsaktivitätsindex (ESSDAI).

Abb.9A und B stellen Mittelwerte \pm SD dar; die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen MWU-Test (Mann Whitney U-Test) ermittelt. Abb. 9B ROC-Kurve: ROC-Kurve und area under the curve (AUC) für STAT1 in Plasmablasten, d. h. GL vs. EGL: STAT1 kann zwischen GL- und EGL-Patient:innen differenzieren. (AUC; 95% Konfidenzintervall; CI). Abb. 9C und 9D Korrelationsmatrizen mit Darstellung von Spearman rho (positive Korrelation = blau, inverse Korrelationen = rot), Größe und Intensität der Farbe beziehen sich auf die Stärke der Korrelation. Die statistische Signifikanz wird wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Quelle: modifizierte Abbildung aus Ritter et al., 2024 (5).

3.7. Einfluss von Jak-Inhibition auf den Jak/STAT Signalweg in B-Zellsubpopulationen

Die therapeutischen Optionen beim pSS sind bisher sehr begrenzt und für systemische Manifestationen stehen lediglich Glukokortikoide und verschiedene Immunmodulatoren im Off-label Gebrauch zur Verfügung. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer genaueren Untersuchung der Pathophysiologie des pSS und daraus ableitender möglicher therapeutischer Zielstrukturen. Die Publikation Ritter J et al. (2024) legt den Einsatz von Jak-Inhibitoren bei Patient:innen mit einem pSS und erhöhter Interferon Aktivität nahe (5). Aktuell werden Jak-Inhibitoren jedoch lediglich bei Patient:innen mit einem pSS in verschiedenen klinischen Studien eingesetzt. Daher wurde exemplarisch an Hand von vier Patient:innen mit einer rheumatoiden Arthritis, die unter einer Therapie mit einem Jak-Inhibitor standen, der IFN Signalweg analysiert. Insgesamt zeigte die Untersuchung, dass Jak-Inhibitoren zu einer Reduzierung der STAT1, STAT2 und IRF9 Level in den verschiedenen B-Zellsubpopulationen führt (**Abb. 11**). Dies deutet auf eine Reduktion der IFN induzierten Aktivierung von B-Zellsubpopulationen hin und zeigt die Möglichkeit, dass die Moleküle des IFN Signalweges als Marker für die Ansprechrate beim Einsatz von Jak-Inhibitoren in Patient:innen genutzt werden können.

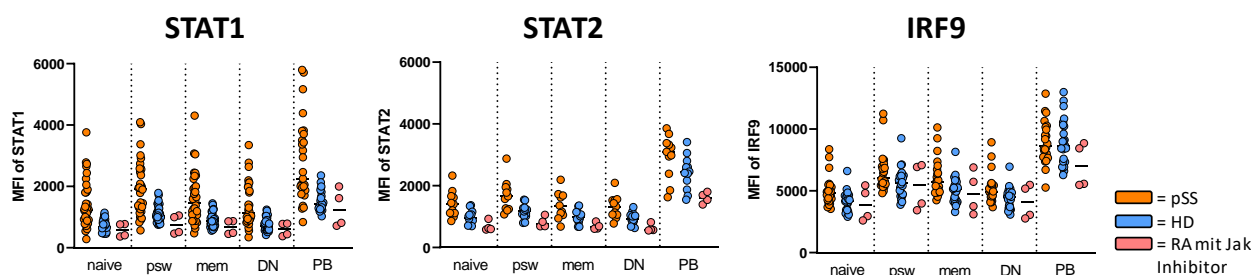


Abbildung 11: Einfluss von Jak-Inhibition auf Signalmoleküle des Jak/STAT Signalweges in rheumatoider Arthritis.

Expression von STAT1, STAT2 und IRF9 in naiven- (naive, CD27⁻, IgD⁺), psw-Gedächtnis- (psw, CD27⁺ IgD⁺), Gedächtnis- (mem, CD27⁺ IgD⁻), Doppelt negative- (DN, CD27⁻ IgD⁻) B Zellen und Plasmablasten (PB, CD20^{low} CD27⁺⁺) in Gesunden, Sjögren Syndrom Patient:innen und rheumatoide Arthritis (RA) Patient:innen mit Jak-Inhibitoren. (HDs in blau, n=38; pSS-Patient:innen in orange, n=34; RA mit Jak-Inhibitor, n=4). Quelle: eigene Abbildung.

4. Diskussion

4.1. Kurze Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Interferon-Signalkaskade bestehend aus STAT1, STAT2 und IRF9 in T- und B-Zellsubpopulationen bei viraler COVID-19 Erkrankung, COVID-19 Impfungen, gesunden Frauen mit Anti-SSA Antikörpern mit CHB Risiko und schließlich bei Patient:innen mit einem primären Sjögren Syndrom analysiert.

In der Publikation von Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J et al. (2022) konnte gezeigt werden, dass COVID-19 Erkrankte einen aktivierten IFN Signalweg in T- und B-Zellsubpopulationen im Vergleich zur gesunden Kontrolle aufwiesen. Bei schweren COVID-19 Verläufen zeigte sich jedoch eine gestörte Signalweiterleitung. Zusätzlich konnte durch Langzeit IFN-Stimulation bei gesunden Kontrollen, STAT1 Proteine hoch exprimiert werden und unabhängig von der Phosphorylierung agieren (11).

Die Publikation Ritter et al. (2024) untersuchte Patient:innen mit einem primären Sjögren Syndrom. Hier fanden sich deutlich erhöhte STAT1, STAT2 und IRF9-Werte in verschiedenen T- und B-Zellsubpopulationen, welche insbesondere bei Patient:innen mit extraglandulärer Manifestation und mit serologischer Aktivität (Anti-SSA Autoantikörpern etc.) nachweisbar waren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass STAT1 als Biomarker für die Unterteilung in glanduläre und extraglanduläre pSS-Subgruppen und IRF9 als Biomarker für die Krankheitsaktivität dient (5).

Gesunde Anti-SSA+ Frauen („at-risk“) wiesen in T- und B-Zellsubpopulationen erhöhte IFN Signalwegmoleküle auf, ähnlich zu den Werten von pSS Patient:innen. Interessanterweise war die prozentuale Verteilung der B-Zellsubpopulationen bei diesen Frauen vergleichbar mit der gesunder Kontrollkohorte, während nur die pSS Patient:innen eine abweichende Verteilung der B-Zellsubpopulationen aufwiesen.

4.2. Interpretation der Ergebnisse und Einbettung in den Forschungsstand

Die Ergebnisse bezüglich erhöhter Siglec-1, STAT1, STAT2 und IRF9-Werte bei Patient:innen mit COVID-19 Erkrankungen zeigen den Stellenwert von Interferonen in der viralen Immunantwort. Gleichwohl sind bei schweren COVID-19 Verläufen gestörte Interferon alpha Produktion und Aktivität und in ca. 10% der Fälle Autoantikörper gegen Typ I IFN beschrieben worden (10, 40). In unserer Kohorte fanden sich niedrigere Siglec-1

und STAT1 Werte insbesondere in Plasmablasten und Monozyten bei Patient:innen mit schweren COVID-19 Verläufen im Vergleich zu milden COVID-19 Verläufen (11). Unsere Daten legen daher auch eine gestörte IFN-Jak-STAT Signalweiterleitung in den Zellen des adaptiven Immunsystems bei schweren COVID-19 Verläufen nahe. Eventuell besteht hier ein Zusammenhang zur eintretenden Anergie/Eerschöpfung bei langwieriger Immunstimulation einschließlich der nachfolgenden TGF-beta Dominanz, die andere Signalwege als JAK/STAT benutzt (41).

Neben der klassischen, durch IFN ausgelösten Signalkaskade von phosphorylierten pSTATs gibt es auch Publikationen, die auf eine durch chronische IFN-Exposition ausgelöste Signalaktivität von unphosphoryliertem (U-) STAT1, U-STAT2 und IRF9 hinweisen (3, 42-44). Dabei führte die initiale Aktivierung von pSTATs durch IFN Stimulation nach einigen Stunden zur Reduktion des ursprünglich gebildeten phosphorylierten STAT1 und ließ U-STAT1 innerhalb von 24 Stunden neu synthetisieren und ansteigen (43). Diese Ergebnisse spiegeln sich in unseren Daten wider. Hohe Werte von unphosphorylierten STAT1 in COVID-19 Patient:innen, lassen auf die persistierende IFN Aktivität mit erhöhter Transkriptionsaktivität während der viralen Clearance schließen. Zusätzlich zeigten wir in 48 Stunden Stimulationsexperimenten, dass die Werte von STAT1 nach 48 h Stimulation mit IFN α und IFN γ weiter anstiegen. Dies zeigten wir insbesondere in gesunden Kontrollen, welche zuvor keine erhöhten Baseline IFN Signalmoleküle aufwiesen (11).

In meiner Dissertation konnte ich über die Publikation hinaus den intrazellulären IFN-Signalweg in T- und B-Zellsubpopulationen nach mRNA-Vakzinierungen in einem Follow-up untersuchen.

Zusammenfassend konnte dabei die Aktivierung von T- und B Zellsubpopulationen, insbesondere nach der zweiten Booster Impfung, gezeigt werden.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus diesen Untersuchungen war, dass STAT1 und auch IRF9 longitudinal als dynamischer Marker der Immunantwort anzusehen sind.

Autoreaktive B-Zellen, Autoantikörperproduktion (Anti-SSA, Anti-SSB) sowie eine prominente IFN-Signatur sind Hauptmerkmale der Pathophysiologie des pSS. Allerdings sind die Zusammenhänge zwischen beiden Charakteristika auf funktioneller Ebene nicht gut verstanden. In mehreren Studien wurde bereits die dominierende Rolle von IFN in der Pathogenese vom pSS beschrieben (20, 45). Der Schwerpunkt der meisten Studien lag

jedoch auf der Expression von Interferongen (u.a. IFN44, MX1) in peripheren Immunzellen und insbesondere dem Speicheldrüsengewebe (20, 33, 46).

In meiner Publikation Ritter et al. (2024) konnte gezeigt werden, dass die Moleküle des IFN-Jak-STAT Signalweges auf Proteinebene in verschiedenen T- und B-Zellsubpopulationen erhöht sind, es jedoch keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich der Phosphorylierungen von pSTAT1 und pSTAT2 gibt. Darüber hinaus ergab die Berechnung von STAT1/pSTAT1 und STAT2/pSTAT2 Ratios eine Prominenz von STAT-Proteinen in Abwesenheit von einer Phosphorylierung (5). Dies deutet auf den Einfluss der chronischen IFN-Exposition hin, welcher, ähnlich dem der viralen Clearance bei den COVID-19 Experimenten, zu einer Aktivität des IFN-Jak-STAT Signalweges ohne Phosphorylierung führt. Wichtig im Vergleich zur Virusabwehr ist, dass im Gegensatz zur Rückbildung der IFN-Signatur nach Viruselimination (Kontraktion), diese bei Kollagenosen wie dem pSS persistieren. Diese chronische IFN Aktivierung unterhält offenbar die Entzündung und die Autoimmunität im pSS.

Die Ergebnisse über STAT1- und IRF9-Moleküle in Zellsubpopulationen, die mit der Autoantikörperproduktion korrelieren, legen nahe, dass IFN-Signale für die B-Zell-Aktivierung und die Bildung von Autoantikörpern beim pSS von Relevanz sind. Dies wird durch eine Studie mit Knockout-Mäusen unterstützt, welche zeigte, dass STAT1 und IRF9 in der Signalkaskade des Typ-I-IFN-Rezeptors für die Bildung von IgG-Autoantikörpern notwendig sind (47).

Vor Kurzem konnte Gupta et al. mittels RNA-Sequenzierung und Transkriptom-Daten eine Aktivierung des IFN-Jak-STAT Signalweges in Speicheldrüsengewebe in pSS Patient:innen zeigen. Zusätzlich testeten die Autoren Tofacitinib, einen semiselektiven JAK3/JAK1 Inhibitor, welcher zu einer Inhibition der Phosphorylierung von verschiedenen Jak/STAT-Signalmolekülen und zu einer Reduktion der ISG mRNA Expression in Speicheldrüsen Epithelzellen führte (48). Meine Daten sind im Einklang mit Gupta et al. und unterstützen diese darüber hinaus. Wir konnten eine ähnliche Aktivierung und Charakterisierung in T- und B-Zellsubpopulationen beim pSS beschreiben (5). Zusätzlich konnte ich in einem ersten Proof-of-concept bei mit Tofacitinib (Jak3/Jak1-Inhibitor) therapierten Patient:innen mit rheumatoider Arthritis eine Reduzierung von STAT1 zeigen.

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass die erhöhte molekulare IFN Signatur in T- und B-Zellsubpopulationen sich in erhöhter klinischer Aktivität von pSS Patient:innen widerspiegelt und global alle untersuchten Zellsubpopulationen beeinflusst.

Die Daten zu asymptomatischen schwangeren Frauen mit Anti-SSA Autoantikörpern und einem erhöhten Risiko für einen kongenitalen Herzblock geben einen Einblick in eine seltene Schwangerschaftskomplikation. Anti-SSA Antikörper können transplazentar an das ungeborene Kind weitergegeben werden und dort einen AV-Block auslösen. Zusätzlich zu Anti-SSA Autoantikörpern konnte IFN als Risikofaktor identifiziert werden (36).

Die Daten meiner Dissertation zeigen nun erstmalig die erhöhte Aktivierung des IFN-Signalweges in T- und B-Zellsubpopulationen bei klinisch gesunden Frauen mit Anti-SSA Autoantikörpern und einem Risiko für ein CHB. Interessanterweise haben die asymptomatischen „at-risk“ Frauen mit Anti-SSA Autoantikörpern und einer Typ I Interferonsignatur keine klinischen Symptome eines pSS. Beim pSS führt neben der pathophysiologischen Interferonsignatur auch eine B-Zell Störung zur Erkrankung (28). Es wurde bereits eine gestörte Verteilung von B-Zellsubpopulationen beschrieben (29). Diese pathologische B-Zell Verteilung konnte nicht in den „at-risk“ Frauen nachgewiesen werden und nur die Ergebnisse zum pSS repliziert werden. Die Daten unterstützen daher die Hypothese, dass für die klinische Manifestation im pSS, neben der erhöhten IFN-Aktivität, auch eine gestörte B-Zell Verteilung und deren Aktivierung eine Rolle spielen.

4.3. Stärken und Limitationen

Diese Arbeit charakterisierte zum ersten Mal das Zusammenspiel zwischen IFN-Signalmolekülen und deren Phosphorylierungsstatus bei peripheren T- und B-Zellsubpopulationen bei COVID-19 und beim pSS. Auch wenn schon Daten zu IFN-bedingten Veränderungen auf Gen- und mRNA-Ebene bei pSS Patient:innen beschrieben wurden, konnte meine Dissertation mit der Beschreibung der IFN Signalwegmoleküle auf Proteinebene neue Erkenntnisse liefern. Insbesondere die Untersuchungen von STAT1 und IRF9 intrazellulär in den Zellsubpopulationen und auch als Biomarker, stellen Stärken dieser Arbeit dar. Zusätzlich konnten neue Ergebnisse in Bezug auf Anti-SSA+ „at-risk“ Frauen gewonnen werden, welches eine seltene Konstellation darstellt.

Die oben genannten Studien weisen Limitationen auf. Das pSS stellt eine heterogene Erkrankung mit unterschiedlichen klinischen Manifestationen und Verläufen dar. Insgesamt befand sich die pSS-Kohorte in einem milden Zustand und keiner der Teilnehmen-

den litt an schweren systemischen Manifestationen, wie z.B. ZNS-Beteiligungen. Zweitens kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Therapien der Patient:innen die Ergebnisse beeinflusst haben. Dies wurde zwar für die Publikation Ritter et al. (2024) statistisch untersucht (siehe *Supplementary figures*) und ausgeschlossen (5), kann jedoch für die schweren COVID-19 Verläufe in der ersten Publikation von Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J et al. (2022) nicht gänzlich ausgeschlossen werden (11). Weitere Einschränkungen waren die begrenzte Stichprobengröße, insbesondere für die verschiedenen Untergruppen (schwere COVID-19 Verläufe, „at-risk“ Frauen und pSS Subgruppen), die die statistische Aussagekraft einschränken. Allerdings konnten trotz der möglichen Einschränkungen eindeutig statistisch signifikante Ergebnisse gefunden werden.

Neuere Studien werden zeigen, ob die Inhibition des IFN Signalweges (u.a. mit JAK-Inhibitoren) erfolgsversprechend ist. Zusätzlich werden die Biomarker STAT1 und IRF9 in weiteren größeren Studien und der klinischen Anwendung erprobt werden müssen.

4.4. Implikationen für die Praxis und zukünftige Forschung

Eine gestörte IFN Signalweiterleitung stellt einen Risikofaktor in der Immunabwehr bei viralen Infektionen dar und prädisponiert zu höherer Mortalität und Morbidität. Dies ist insbesondere durch die hohe Relevanz viraler Infektionen für die Allgemeinbevölkerung von Bedeutung. Die Ergebnisse bezüglich einer gestörten IFN Signalkaskade in schweren COVID-19 Verläufen könnten sich daher auch auf andere virale Erreger übertragen lassen. Die Identifizierung solcher Risikopopulationen könnte langfristig zu einer besseren Überwachung führen und das Überleben während viraler Infektionen verbessern.

Nach wie vor fehlen zielgerichtete und wirksame Therapien in der Behandlung des primären Sjögren Syndroms (49). Eine bessere Charakterisierung der Pathophysiologie (insbesondere der B-Zellen und des Interferons) und die Identifikation von Patient:innen-subgruppen lassen hoffen, dass neue spezifische Therapien identifiziert und zugelassen werden (27).

Meine Daten, zusammen mit anderen Studien, legen daher nahe, die Mechanismen in der Regulation des Interferonsignalweges für therapeutische Interventionen weitergehend zu analysieren und ggf. therapeutisch zu adressieren.

Neben der Charakterisierung des IFN-Signalweges lassen sich die Moleküle, STAT1 und IRF9, auch als Überwachungs- und Stratifizierungsbiomarker bei heterogenen Erkrankungen, wie dem pSS nutzen. In diesem Zusammenhang können die Daten der Dissertation einen Beitrag leisten. STAT1 kann hier als potentieller Biomarker kandidieren, um die IFN-Hemmung und Ansprechen zu evaluieren.

Der Einschluss von undifferenzierten und zu breiten Patient:innensubgruppen, die womöglich unter unterschiedlichen Pathophysiologien leiden, könnte einen entscheidenden Fehler in der Durchführung von klinischen Studien beim pSS darstellen. Mittels enger definierter Einschlusskriterien, die auch pathophysiologische Aspekte miteinbeziehen, z.B. durch Messungen der basalen STAT1 Levels, könnten bereits frühzeitig mögliche Responder angereichert werden, die von einer anti-IFN-Therapie profitieren könnten.

Identifikation von Patient:innensubgruppen, spezifische Biomarker zur Stratifizierung und Überwachung in klinischen Studien geben Grund zur Annahme, dass die Therapie des primären Sjögren Syndrom in Zukunft verbessert werden kann. Insgesamt unterstreichen meine Daten die bedeutende Rolle des IFN-Jak-STAT Signalweges in pSS-Patient:innen und legen diese als therapeutische Zielstruktur nahe.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend beschäftigt sich diese Dissertation mit der Charakterisierung des IFN Signalweges in T- und B-Zellsubpopulationen. Neben einer besseren Charakterisierung wurde auch der Einfluss einer chronischen IFN-Exposition auf die Zellen untersucht.

In der ersten Publikation konnte bei schweren COVID-19 Verläufen eine deutlich gestörte Signalweiterleitung und damit eingeschränkte IFN-Aktivität festgestellt werden. Zusätzlich konnte durch Langzeit IFN-Stimulation bei gesunden Kontrollen STAT1 Proteine hoch exprimiert werden (11).

Bei Patient:innen mit einem pSS ging die kontinuierliche Immunaktivierung von T- und B-Zellsubpopulationen mit serologischer und klinischer Aktivität einher. Hier konnte mit STAT1 ein neuer Biomarker für die Identifizierung von Patient:innensubgruppen beschrieben werden (5).

Im Ergebnis deuten diese Daten auf eine vielschichtige Rolle des Interferons in viraler Abwehr und in der Autoimmunerkrankung pSS hin. Insbesondere für das pSS geben die Ergebnisse neue Biomarker vor und unterstreichen die Rationale für Anti-IFN gerichtete Therapien.

Literaturverzeichnis

1. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957;147(927):258-67.
2. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2005;5(5):375-86.
3. Michalska A, Blaszczyk K, Wesoly J, Bluysen HAR. A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses. *Front Immunol.* 2018;9:1135.
4. Forero A, Ozarkar S, Li H, Lee CH, Hemann EA, Nadsjombati MS, Hendricks MR, So L, Green R, Roy CN, Sarkar SN, von Moltke J, Anderson SK, Gale M, Jr., Savan R. Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity.* 2019;51(3):451-64.e6.
5. Ritter J, Szelinski F, Aue A, Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Chen Y, Nitschke E, Dang VD, Wiedemann A, Schrezenmeier E, Lino AC, Dörner T. Elevated unphosphorylated STAT1 and IRF9 in T and B cells of primary sjögren's syndrome: Novel biomarkers for disease activity and subsets. *J Autoimmun.* 2024;147:103243.
6. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:275-306.
7. Dalskov L, Gad HH, Hartmann R. Viral recognition and the antiviral interferon response. *Embo j.* 2023;42(14):e112907.
8. Katze MG, He Y, Gale M, Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(9):675-87.
9. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Sabli IKD, Hodeib S, Korol C, Rosain J, Bilguvar K, Ye J, Bolze A, Bigio B, Yang R, Arias AA, Zhou Q, Zhang Y, Onodi F, Korniotis S, Karpf L, Philippot Q, Chbihi M, Bonnet-Madin L, Dorgham K, Smith N, Schneider WM, Razooky BS, Hoffmann HH, Michailidis E, Moens L, Han JE, Lorenzo L, Bizien L, Meade P, Neehus AL, Ugurbil AC, Corneau A, Kerner G, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Manry J, Masson C, Schmitt Y, Schlüter A, Le Voyer T, Khan T, Li J, Fellay J, Roussel L, Shahrooei M, Alosaimi MF, Mansouri D, Al-Saud H, Al-Mulla F, Almourfi F, Al-Muhsen SZ, Alsohime F, Al Turki S, Hasanato R, van de Beek D, Biondi A, Bettini LR, D'Angio M, Bonfanti P, Imberti L, Sottini A, Paghera S, Quiros-Roldan E, Rossi C, Oler AJ, Tompkins MF, Alba C, Vandernoot I, Goffard JC, Smits G, Migeotte I, Haerynck F, Soler-Palacin P, Martin-Nalda A, Colobran R, Morange PE, Keles

S, Çölkesen F, Ozcelik T, Yasar KK, Senoglu S, Karabela Ş N, Rodríguez-Gallego C, Novelli G, Hraiech S, Tandjaoui-Lambiotte Y, Duval X, Laouénan C, Snow AL, Dalgard CL, Milner JD, Vinh DC, Mogensen TH, Marr N, Spaan AN, Boisson B, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Puel A, Ciancanelli MJ, Meyts I, Maniatis T, Soumelis V, Amara A, Nussenzweig M, García-Sastre A, Krammer F, Pujol A, Duffy D, Lifton RP, Zhang SY, Gorochov G, Béziat V, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, Rice CM, Abel L, Notarangelo LD, Cobat A, Su HC, Casanova JL. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370(6515).

10. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, Dorgham K, Philippot Q, Rosain J, Béziat V, Manry J, Shaw E, Haljasmägi L, Peterson P, Lorenzo L, Bizien L, Trouillet-Assant S, Dobbs K, de Jesus AA, Belot A, Kallaste A, Catherinot E, Tandjaoui-Lambiotte Y, Le Pen J, Kerner G, Bigio B, Seeleuthner Y, Yang R, Bolze A, Spaan AN, Delmonte OM, Abers MS, Aiuti A, Casari G, Lampasona V, Piemonti L, Ciceri F, Bilguvar K, Lifton RP, Vasse M, Smadja DM, Migaud M, Hadjadj J, Terrier B, Duffy D, Quintana-Murci L, van de Beek D, Roussel L, Vinh DC, Tangye SG, Haerynck F, Dalmau D, Martinez-Picado J, Brodin P, Nussenzweig MC, Boisson-Dupuis S, Rodríguez-Gallego C, Vogt G, Mogensen TH, Oler AJ, Gu J, Burbelo PD, Cohen JI, Biondi A, Bettini LR, D'Angio M, Bonfanti P, Rossignol P, Mayaux J, Rieux-Laucat F, Husebye ES, Fusco F, Ursini MV, Imberti L, Sottini A, Paghera S, Quiros-Roldan E, Rossi C, Castagnoli R, Montagna D, Licari A, Marseglia GL, Duval X, Ghosn J, Tsang JS, Goldbach-Mansky R, Kisand K, Lionakis MS, Puel A, Zhang SY, Holland SM, Gorochov G, Jouanguy E, Rice CM, Cobat A, Notarangelo LD, Abel L, Su HC, Casanova JL. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370(6515).

11. Rincon-Arevalo H, Aue A, Ritter J, Szelinski F, Khadzhynov D, Zickler D, Stefanski L, Lino AC, Körper S, Eckardt KU, Schrezenmeier H, Dörner T, Schrezenmeier EV. Altered increase in STAT1 expression and phosphorylation in severe COVID-19. *Eur J Immunol*. 2022;52(1):138-48.

12. Aue A, Szelinski F, Weißenberg SY, Wiedemann A, Rose T, Lino AC, Dörner T. Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology*.

13. Hall JC, Baer AN, Shah AA, Criswell LA, Shiboski CH, Rosen A, Casciola-Rosen L. Molecular Subsetting of Interferon Pathways in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(9):2437-46.

14. Fillatreau S, Manfroi B, Dorner T. Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* 2021;17(2):98-108.
15. Fleischmann R, Pangan AL, Song IH, Mysler E, Bessette L, Peterfy C, Durez P, Ostor AJ, Li Y, Zhou Y, Othman AA, Genovese MC. Upadacitinib Versus Placebo or Adalimumab in Patients With Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response to Methotrexate: Results of a Phase III, Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(11):1788-800.
16. Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün JR, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, Häupl T, Rudwaleit M, Riemekasten G, Radbruch A, Hiepe F, Burmester G-R, Grützkau A. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 2008;58(4):1136-45.
17. Rose T, Szelinski F, Lisney A, Reiter K, Fleischer SJ, Burmester GR, Radbruch A, Hiepe F, Grützkau A, Biesen R, Dörner T. SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjögren's syndrome. *RMD Open.* 2016;2(2).
18. Aue A, Szelinski F, Weißenberg SY, Wiedemann A, Rose T, Lino AC, Dörner T. Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology (Oxford).* 2020;59(11):3435-42.
19. Beydon M, McCoy S, Nguyen Y, Sumida T, Mariette X, Seror R. Epidemiology of Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2024;20(3):158-69.
20. Brkic Z, Maria NI, Helden-Meeuwsen CGv, Merwe JPvd, Daele PLv, Dalm VA, Wildenberg ME, Beumer W, Drexhage HA, Versnel MA. Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2013;72(5):728-35.
21. Stefanski AL, Tomiak C, Pleyer U, Dietrich T, Burmester GR, Dörner T. The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(20):354-61.
22. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Solans R, Camps MT, Casanovas A, Sopeña B, Díaz-López B, Rascón FJ, Qanneta R, Fraile G, Pérez-Alvarez R, Callejas JL, Ripoll M, Pinilla B, Akasbi M, Fonseca E, Canora J, Nadal ME, de la Red G, Fernández-Regal I, Jiménez-Heredia I, Bosch JA, Ayala MD, Morera-Morales L, Maure B, Mera A, Ramentol

- M, Retamozo S, Kostov B. Systemic involvement in primary Sjogren's syndrome evaluated by the EULAR-SS disease activity index: analysis of 921 Spanish patients (GEAS-SS Registry). *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(2):321-31.
23. Seror R, Bootsma H, Saraux A, Bowman SJ, Theander E, Brun JG, Baron G, Le Guern V, Devauchelle-Pensec V, Ramos-Casals M, Valim V, Dörner T, Tzioufas A, Gottenberg JE, Solans Laqué R, Mandl T, Hachulla E, Sivils KL, Ng WF, Fauchais AL, Bombardieri S, Priori R, Bartoloni E, Goeb V, Praprotnik S, Sumida T, Nishiyama S, Caporali R, Kruize AA, Vollenweider C, Ravaud P, Meiners P, Brito-Zerón P, Vitali C, Mariette X. Defining disease activity states and clinically meaningful improvement in primary Sjögren's syndrome with EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient-reported indexes (ESSPRI). *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):382-9.
24. Mariette X, Criswell LA. Primary Sjögren's Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2018.
25. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, Rasmussen A, Scofield H, Vitali C, Bowman SJ, Mariette X. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):9-16.
26. Veenbergen S, Kozmar A, van Daele PLA, Schreurs MWJ. Autoantibodies in Sjögren's syndrome and its classification criteria. *J Transl Autoimmun*. 2022;5:100138.
27. Ritter J, Chen Y, Stefanski AL, Dörner T. Current and future treatment in primary Sjögren's syndrome - A still challenging development. *Joint Bone Spine*. 2022;89(6):105406.
28. Nocturne G, Mariette X. B cells in the pathogenesis of primary Sjögren syndrome. *Nature Reviews Rheumatology*. 2018;14(3):133-45.
29. Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, Burmester GR, Lipsky PE, Dörner T. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46(8):2160-71.
30. Broeren MGA, Wang JJ, Balzaretto G, Groenen P, van Schaik BDC, Chataway T, Kaffa C, Bervoets S, Hebeda KM, Bounova G, Pruijn GJM, Gordon TP, De Vries N, Thurlings RM. Proteogenomic analysis of the autoreactive B cell repertoire in blood and tissues of patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2022.

31. Yao Y, Liu Z, Jallal B, Shen N, Rönnblom L. Type I interferons in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2013;12(5):558-66.
32. Verstappen GM, Gao L, Pringle S, Haacke EA, van der Vegt B, Liefers SC, Patel V, Hu Y, Mukherjee S, Carman J, Menard LC, Spijkervet FKL, Vissink A, Bootsma H, Kroese FGM. The Transcriptome of Paired Major and Minor Salivary Gland Tissue in Patients With Primary Sjögren's Syndrome. *Front Immunol.* 2021;12:681941.
33. Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum.* 2005;52(5):1534-44.
34. Maria NI, Brkic Z, Waris M, van Helden-Meeuwsen CG, Heezen K, van de Merwe JP, van Daele PL, Dalm VA, Drexhage HA, Versnel MA. MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(6):1052-9.
35. Brito-Zerón P, Izmirly PM, Ramos-Casals M, Buyon JP, Khamashta MA. The clinical spectrum of autoimmune congenital heart block. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(5):301-12.
36. Lisney AR, Szelinski F, Reiter K, Burmester GR, Rose T, Dörner T. High maternal expression of SIGLEC1 on monocytes as a surrogate marker of a type I interferon signature is a risk factor for the development of autoimmune congenital heart block. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(8):1476-80.
37. Verstappen GM, Kroese FGM. A leading role for interferon as a treatment target in Sjögren syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2023;19(8):468-9.
38. Price E, Bombardieri M, Kivitz A, Matzkies F, Gurtovaya O, Pechonkina A, Jiang W, Downie B, Mathur A, Mozaffarian A, Mozaffarian N, Gottenberg JE. Safety and efficacy of filgotinib, lanraplenib and tirabrutinib in Sjögren's syndrome: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Rheumatology (Oxford).* 2022;61(12):4797-808.
39. Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, Gottenberg JE, Bootsma H, Mariette X, Vitali C. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):1103-9.
40. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, Péré H, Charbit B, Bondet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P, Carlier N, Gauzit R, Morbieu C, Pène F, Marin N, Roche N, Szwebel TA, Merklings SH, Treluyer JM, Veyer D, Mouthon L, Blanc

C, Tharaux PL, Rozenberg F, Fischer A, Duffy D, Rieux-Laucat F, Kernéis S, Terrier B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 2020;369(6504):718-24.

41. Ferreira-Gomes M, Kruglov A, Durek P, Heinrich F, Tizian C, Heinz GA, Pascual-Reguant A, Du W, Mothes R, Fan C, Frischbutter S, Habenicht K, Budzinski L, Ninnemann J, Jani PK, Guerra GM, Lehmann K, Matz M, Ostendorf L, Heiberger L, Chang HD, Bauherr S, Maurer M, Schönrich G, Raftery M, Kallinich T, Mall MA, Angermair S, Treskatsch S, Dörner T, Corman VM, Diefenbach A, Volk HD, Elez Kurtaj S, Winkler TH, Dong J, Hauser AE, Radbruch H, Witkowski M, Melchers F, Radbruch A, Mashreghi MF. SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF- β -dominated chronic immune response that does not target itself. *Nat Commun*. 2021;12(1):1961.

42. Majoros A, Platanitis E, Kernbauer-Hölzl E, Rosebrock F, Müller M, Decker T. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Front Immunol*. 2017;8:29.

43. Cheon H, Stark GR. Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9373-8.

44. Stark GR, Cheon H, Wang Y. Responses to Cytokines and Interferons that Depend upon JAKs and STATs. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(1).

45. Bodewes ILA, Al-Ali S, van Helden-Meeuwsen CG, Maria NI, Tarn J, Lendrem DW, Schreurs MWJ, Steenwijk EC, van Daele PLA, Both T, Bowman SJ, Griffiths B, Ng WF, Versnel MA. Systemic interferon type I and type II signatures in primary Sjögren's syndrome reveal differences in biological disease activity. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(5):921-30.

46. Chen X, Jiang S, Zhou Z, Xu X, Ying S, Du L, Qiu K, Xu Y, Wu J, Wang X. Increased expression of interleukin-21-inducible genes in minor salivary glands are associated with primary Sjögren's syndrome disease characteristics. *Rheumatology (Oxford)*. 2020.

47. Thibault DL, Chu AD, Graham KL, Balboni I, Lee LY, Kohlmoos C, Landrigan A, Higgins JP, Tibshirani R, Utz PJ. IRF9 and STAT1 are required for IgG autoantibody production and B cell expression of TLR7 in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1417-26.

48. Gupta S, Yamada E, Nakamura H, Perez P, Pranzatelli TJ, Dominick K, Jang SI, Abed M, Martin D, Burbelo P, Zheng C, French B, Alevizos I, Khavandgar Z, Beach M, Pelayo E, Walitt B, Hasni S, Kaplan MJ, Tandon M, Magone MT, Kleiner DE, Chiorini JA,

Baer A, Warner BM. Inhibition of JAK-STAT pathway corrects salivary gland inflammation and interferon driven immune activation in Sjögren's disease. *Ann Rheum Dis.* 2024.

49. Fox RI, Fox CM. Sjögren Syndrome: Why Do Clinical Trials Fail? *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(3):519-30.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jacob Ritter , versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung des Interferonsignalweges in T- und B-Zellsubpopulationen bei COVID-19 Erkrankung und beim primären Sjögren Syndrom (engl.: Characterization of the interferon signaling pathway in T and B cell subsets in COVID-19 disease and Sjögren's disease) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Jacob Ritter hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Rincon-Arevalo H*, Aue A*, **Ritter J**, Szelinski F, Khadzhynov D, Zickler D, Stefanski L, Lino AC, Körper S, Eckardt KU, Schrezenmeier H, Dörner T#, Schrezenmeier EV#.

Altered increase in STAT1 expression and phosphorylation in severe COVID-19.

Eur J Immunol. 2022 Jan;52(1):138-148.

Beitrag im Einzelnen:

- Patient:innenrekrutierung der schweren COVID-19 Erkrankten und der Gesunden Kontrolle
- Teile der Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen und Messungen (Baseline Messungen (Abbildung 1, 2))
- Unterstützung bei der Statistischen Auswertung und Interpretation der durchflusszytometrischen Analysen (Abbildung 1, 2)
- Erstellung der Abbildung 1 der Publikation mit den Co-Autoren
- Verfassung der Einleitung und des 1. Abschnittes der Ergebnisse

Publikation 2:

Ritter J, Szelinski F, Aue A, Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Chen Y, Nitschke E, Dang VD, Wiedemann A, Schrezenmeier E, Lino AC, Dörner T.

Elevated unphosphorylated STAT1 and IRF9 in T and B cells of primary sjögren's syndrome: Novel biomarkers for disease activity and subsets.

J Autoimmunity. 2024 May 23;147:103243. Doi: 10.1016/j.jaut.2024.103243.

Beitrag im Einzelnen:

- Literaturrecherche
- Mitentwicklung der Fragestellung
- Teiletablierung der Methoden (STAT2 Messungen)
- Gesamte Durchführung aller durchflusszytometrischer Analysen und Messungen

- Statistische Auswertung und Interpretation der durchflusszytometrischen Analysen
- Erstellung aller Abbildung (1-4) und Tabellen (1,2)
- Verfassung des Manuskriptes (Text, Abbildungen, Tabellen) und Überarbeitungen der Co-Autoren
- Einreichung des Manuskriptes, Korrespondenz mit dem Journal und Bearbeitung des Peer-Review Prozesses

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List (2022)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2022** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"Immunology"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 161 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
1	NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY	66,033	100.3	0.07444
2	Immunity	77,462	32.4	0.10298
3	NATURE IMMUNOLOGY	58,377	30.5	0.07154
4	Annual Review of Immunology	20,103	29.7	0.01519
5	Science Immunology	11,760	24.8	0.04142
6	Cellular & Molecular Immunology	13,869	24.1	0.02049
7	TRENDS IN IMMUNOLOGY	17,527	16.8	0.01833
8	Lancet HIV	5,796	16.1	0.01671
9	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE	70,263	15.3	0.05863
10	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	29,784	15.1	0.03582
11	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	60,069	14.2	0.05780
12	AUTOIMMUNITY REVIEWS	13,910	13.6	0.01330
13	Emerging Microbes & Infections	11,189	13.2	0.01885
14	JOURNAL OF AUTOIMMUNITY	11,240	12.8	0.01279
15	ALLERGY	24,704	12.4	0.02675
16	CLINICAL INFECTIOUS DISEASES	94,663	11.8	0.13925
17	EMERGING INFECTIOUS DISEASES	39,490	11.8	0.04703
18	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	23,254	10.9	0.04859
19	Cancer Immunology Research	12,883	10.1	0.01987
20	Journal of Allergy and Clinical Immunology-In Practice	13,968	9.4	0.03056
21	Journal of Neuroinflammation	26,022	9.3	0.02759

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
22	npj Vaccines	3,551	9.2	0.00954
23	CLINICAL REVIEWS IN ALLERGY & IMMUNOLOGY	5,688	9.1	0.00691
24	JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY	7,586	9.1	0.00988
25	Seminars in Immunopathology	6,135	9.0	0.00664
26	IMMUNOLOGICAL REVIEWS	19,832	8.7	0.01614
27	CLINICAL IMMUNOLOGY	11,184	8.6	0.01006
28	Inflammation and Regeneration	1,392	8.1	0.00210
29	HLA	1,550	8.0	0.00174
30	Mucosal Immunology	10,754	8.0	0.01478
31	Immunity & Ageing	2,018	7.9	0.00249
32	SEMINARS IN IMMUNOLOGY	7,355	7.8	0.00634
33	Vaccines	23,664	7.8	0.03638
34	JOURNAL OF MICROBIOLOGY IMMUNOLOGY AND INFECTION	5,137	7.4	0.00579
35	EXERCISE IMMUNOLOGY REVIEW	973	7.3	0.00043
36	Frontiers in Immunology	163,472	7.3	0.26328
37	JOURNAL OF INVESTIGATIONAL ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	2,647	7.2	0.00197
38	Oncolmunology	16,708	7.2	0.02153
39	CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY	10,494	7.0	0.00994
40	ALLERGOLOGY INTERNATIONAL	3,394	6.8	0.00378
41	BIODRUGS	2,991	6.8	0.00374
42	INFLAMMATION RESEARCH	6,644	6.7	0.00452
43	IMMUNOLOGY	14,304	6.4	0.00948

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
44	JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES	49,684	6.4	0.05673
45	Expert Review of Vaccines	6,396	6.2	0.00727
46	TRANSPLANTATION	25,972	6.2	0.02205
47	CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY	11,429	6.1	0.00789
48	Immune Network	2,058	6.0	0.00241
49	Journal of the International AIDS Society	7,409	6.0	0.01546
50	ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY	10,137	5.9	0.01215
51	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	13,315	5.8	0.01346
52	Clinical & Translational Immunology	2,738	5.8	0.00483
53	INFLAMMOPHARMACOLOGY	4,600	5.8	0.00382
54	MICROBES AND INFECTION	6,753	5.8	0.00255
55	Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	26,746	5.7	0.03687
56	International Immunopharmacology	31,549	5.6	0.02791
57	CURRENT ALLERGY AND ASTHMA REPORTS	3,497	5.5	0.00364
58	JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY	20,982	5.5	0.01321
59	Journal of Virus Eradication	681	5.5	0.00139
60	Vaccine	54,259	5.5	0.06296
61	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY	22,585	5.4	0.01175
62	MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY	2,697	5.4	0.00171
63	Journal of Innate Immunity	3,284	5.3	0.00292
64	Virulence	6,972	5.2	0.00641
65	INFLAMMATION	9,132	5.1	0.00730

Druckexemplar der *Publikation 1*

Altered increase in STAT1 expression and phosphorylation in severe COVID-19.

Rincon-Arevalo H*, Aue A*, **Ritter J**, Szelinski F, Khadzhynov D, Zickler D, Stefanski L, Lino AC, Körper S, Eckardt KU, Schrezenmeier H, Dörner T, Schrezenmeier EV.


Eur J Immunol. 2022 Jan;52(1):138-148.

<https://doi.org/10.1002/eji.202149575>



Research Article

Altered increase in STAT1 expression and phosphorylation in severe COVID-19

Hector Rincon-Arevalo^{*1,2,3,4}, Arman Aue^{*1,2,3}, Jacob Ritter^{2,5}, Franziska Szelinski^{2,3}, Dmytro Khadzhyrov¹, Daniel Zickler¹, Luisa Stefanski², Andreia C. Lino³ , Sixten Körper^{6,7}, Kai-Uwe Eckardt¹, Hubert Schrezenmeier^{6,7}, Thomas Dörner^{*2,3} and Eva V. Schrezenmeier^{*1,2,5}

¹ Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

² Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

³ Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ), Berlin, Germany

⁴ Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Médicas Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Colombia

⁵ Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

⁶ Institute for Clinical Transfusion Medicine and Immunogenetics Ulm, German Red Cross Blood Transfusion Service Baden-Württemberg-Hessen, University Hospital Ulm, Baden-Württemberg, Germany

⁷ Institute of Transfusion Medicine, University of Ulm, Baden-Württemberg, Germany

The interferon pathway, a key antiviral defense mechanism, is being considered as a therapeutic target in COVID-19. Both, substitution of interferon and JAK/STAT inhibition to limit cytokine storms have been proposed. However, little is known about possible abnormalities in STAT signaling in immune cells during SARS-CoV-2 infection. We investigated downstream targets of interferon signaling, including STAT1, STAT2, pSTAT1 and 2, and IRF1, 7 and 9 by flow cytometry in 30 patients with COVID-19, 17 with mild, and 13 with severe infection. We report upregulation of STAT1 and IRF9 in mild and severe COVID-19 cases, which correlated with the IFN-signature assessed by Siglec-1 (CD169) expression on peripheral monocytes. Interestingly, Siglec-1 and STAT1 in CD14⁺ monocytes and plasmablasts showed lower expression among severe cases compared to mild cases. Contrary to the baseline STAT1 expression, the phosphorylation of STAT1 was enhanced in severe COVID-19 cases, indicating a dysbalanced JAK/STAT signaling that fails to induce transcription of interferon stimulated response elements (ISRE). This abnormality persisted after IFN- α and IFN- γ stimulation of PBMCs from patients with severe COVID-19. Data suggest impaired STAT1 transcriptional upregulation among severely infected patients may represent a potential predictive biomarker and would allow stratification of patients for certain interferon-pathway targeted treatments.

Keywords: STAT1 · IRF9 · Type I Interferon · COVID-19 · pSTAT1



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Correspondence: Eva V. Schrezenmeier
e-mail: eva-vanessa.schrezenmeier@charite.de

*Hector Rincon-Arevalo, Arman Aue, Thomas Dörner, and Eva V. Schrezenmeier contributed equally to this work.

© 2021 The Authors. European Journal of Immunology published by Wiley-VCH GmbH

www.eji-journal.eu

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Following viral infection, a complex regulatory system of innate and adaptive immune mechanisms is initiated to defend against viral invasion. One of many responses to viral infection is the induction of the pleiotropic cytokine IFN [1]. It acts as a key link between the innate and adaptive immune system. IFN- α (type I IFN) is mainly secreted by plasmacytoid DCs, while IFN- γ (type II IFN) is predominantly produced by NK cells and by certain T cells and macrophages. Both, type I and type II IFN, have diverse but complementary antiviral effects such as induction of apoptosis and activation of macrophages, NK cells, as well as B and T lymphocytes [2, 3].

Regarding severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) infection, IFN-related antiviral response attracted attention since inborn errors of type I IFN and the presence of autoantibodies against type I IFN were found to be associated with a severe course of the disease [4, 5]. Roughly, 10% of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients with severe pneumonia produce neutralizing autoantibodies against IFN- α , IFN- ω , or both, while patients with no or mild disease have no detectable autoantibodies [4]. Further, it has been shown that patients with severe COVID-19 have a highly impaired IFN type I signature, with reduced IFN- α production and activity [6].

Type I IFNs signal through JAK and STAT pathway and thereby stimulate gene expression. After specific binding to the IFN- α receptor (IFNAR), consisting of two chains (IFNAR1 and IFNAR2), autophosphorylation of the newly formed complex leads to phosphorylation of the receptor-associated JAK1 and Tyrosine Kinase 2 (TYK2) [7, 8]. Subsequently, further phosphorylation of cytoplasmic STAT1 and STAT2 induces its dimerization and interaction with IFN regulatory factor 9 (IRF9), a strong enhancer of translocation to the nucleus [9–11]. The activation of STAT1 is achieved by tyrosine phosphorylation on Y701 that is followed by nuclear accumulation [12].

The formation of a complex called IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) binding to IFN-stimulated response elements (ISRE) finally results in stimulation of gene expression [12]. Likewise, the same sequence of biochemical processes leads to the transcriptional influence of IFN- γ (type II IFN), involving the IFN- γ receptor, JAK1 and JAK2, and dimerization of the homodimer STAT1 binding to IFN- γ -activated site (GAS) [1]. Figure 1A schematically depicts JAK/STAT signaling. Although it has been shown that the virus proteins NSP5, ORF7a, N, and ORF6 are able to directly interfere with JAK/STAT signaling by inhibiting translocation of STATs or inhibiting their phosphorylation in SARS-CoV-2-infected cultured cells [13, 14], it is not fully understood how JAK/STAT signaling is altered in immune cells and if a dysbalance in JAK/STAT signaling may contribute to disease severity.

Here, we report an increased STAT1 expression in mild and severe COVID-19 patients compared to controls. Severe COVID cases showed lower STAT1 expression than mild patients, accompanied by elevated phosphorylation of STAT1 at the pY701 phosphate suggesting a disturbance of signal transduction related to

impaired STAT1 transcription, which is not surmountable by additional IFN stimulation.

Results

Cohort characteristics

In the current cohort, we included 17 outpatients with mild COVID-19 during their quarantine (WHO 8-point ordinal scale 1 and 2) and 13 hospitalized patients treated for severe COVID-19 pneumonia on an Intensive Care Unit (ICU) (WHO 8-point ordinal scale ≥ 4) (Table 1) [15]. Age and days post-symptom onset were not significantly different between both groups, while most patients with mild COVID-19 were female. Among patients with severe disease manifestation, six patients subsequently died because of COVID-19.

Reduced STAT1 expression in patients with severe COVID-19

Since severe COVID-19 has a highly impaired IFN type I signature, with especially reduced IFN- α production and activity [16], we initially asked how the major effector downstream targets of type I IFN are affected among patients with COVID-19. We found a significantly increased STAT1 protein expression in all analyzed cell subsets from whole blood analysis, including T cells (CD4⁺ and CD8⁺), B cells (IgD⁺CD27⁻ (Naïve), IgD⁺CD27⁺ (PreSwitched), IgD⁻CD27⁺ (PostSwitched), and IgD⁻CD27⁻ (double negative), plasmablasts (CD20^{low}CD27^{high}), and monocytes (CD14⁺) from all patients with COVID-19 compared to healthy controls (Fig. 1C–E). Most notably, reduced STAT1 was observed in severe COVID-19 cases compared to mild COVID-19 cases, in particular, in CD14⁺ monocytes and plasmablasts, respectively (Fig. 1D and E). We also observed an increased STAT2 expression in CD14⁺, CD4⁺ cells, and all B cell subsets from patients with mild COVID-19 compared to controls (Supporting information Fig. S1A). STAT2 expression in plasmablasts and preSwitch B cell was reduced in patients with severe COVID-19 compared to patients with mild COVID-19 (Supporting information Fig. S1A).

Since STAT1 signaling is mainly regulated through phosphorylation, we were interested in the phosphorylated form of STAT1. Baseline pSTAT1 was significantly increased in monocytes, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, pre-switched B cells (IgD⁺CD27⁺), and plasmablasts from severe COVID-19 patients compared to healthy controls (Fig. 1F–H).

To better understand the relation between the expression of full protein STAT1 and phosphorylated protein (pSTAT1), the ratio of pSTAT1/STAT1 was obtained. A reduced ratio of pSTAT1/STAT1 was observed in plasmablasts and CD14⁺ cells from COVID-19 patients with mild disease compared to those with severe disease (Supporting information Fig. S1B). No differences in pSTAT2 levels were observed among study groups (Supporting information Fig. S1C). These results suggest that

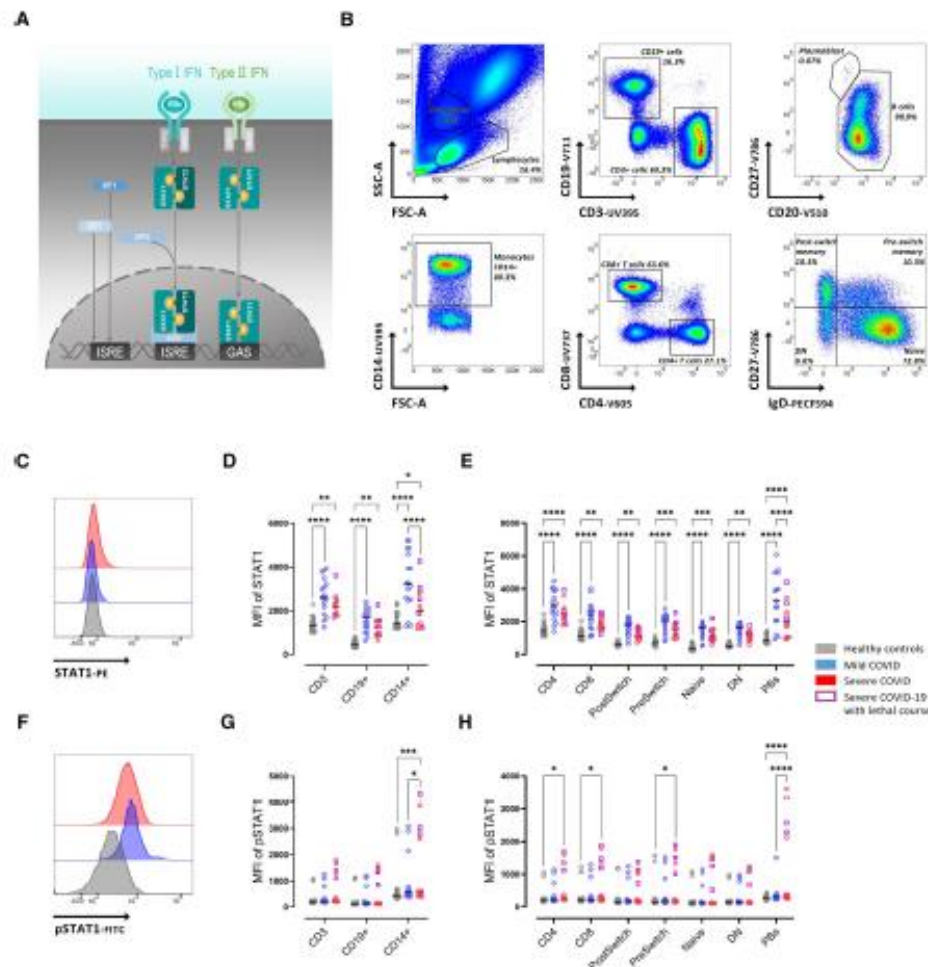


Figure 1. Reduced STAT1 expression in severe COVID-19 patients. (A) Schematic depiction of JAK/STAT signaling. (B) Gating strategy on whole blood flow cytometry for IgD⁺CD27⁻ (Naïve), IgD⁺CD27⁺ (PreSwitch), IgD⁻CD27⁺ (PostSwitched), and IgD⁻CD27⁻ (Double Negative, DN) as well as CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (C) Representative histograms of baseline expression of STAT1 on B cells from healthy controls (grey), mild (blue), and severe (red) COVID-19 patients. (D) Median fluorescence intensity (MFI) of STAT1 in CD3⁺, CD19⁺, and CD14⁺ cells. (E) MFI of STAT1 in T- and B-cell subsets (as described in B). (F) Representative histograms of baseline expression of pSTAT1 on B cells from healthy controls (grey), mild (blue), and severe (red) COVID-19 patients. (G) MFI of pSTAT1 in CD3⁺, CD19⁺, and CD14⁺ cells. (H) MFI of pSTAT1 in T- and B-cell subsets (as described in B). Median and data from healthy controls (n = 20), mild COVID-19 (n = 17), and severe COVID-19 (n = 13) patients. (B–H) Data shown are representative from nine independent experiments. Two-way ANOVA with Sidack post-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001. Deceased patients are indicated as purple quadrats

mildly affected COVID-19 patients increased their STAT1/STAT2 expression, but not their detectable levels of phosphorylation, while severely affected COVID-19 patients showed a greater increase of phosphorylation in relation to the increase of total STAT1 expression. Thus, there is a substantial impairment to increase STAT1 transcription in severe COVID-19 that especially affects CD14⁺ monocytes and plasmablasts.

Reduced IRF9 expression in patients with severe COVID-19

STAT1 is part of IFN-mediated viral response, representing a key components of complexes like ISGF3 and GAS, responsible for amplified IFN-mediated signals [12]. To better understand the nature of STAT1 alteration in patients with COVID-19, IRF9

Table 1. Patient characteristics

	Mild COVID (n = 17)	Severe COVID (n = 13)	Healthy controls (n = 20)
Age (median, IQR)	47.4 (34.0; 57.0)	61 (53.5; 69.5)	35 (29.0; 47.0)
Female	7	1	14
Days post-symptom onset	7 (10; 5.5)	10 (8.5; 15)	
Concomitant antibiotic treatment	0	6	
Immunosuppressive treatment before COVID	4	1	
Dexamethasone	0	12	
Tocilizumab	0	1	
Remdesivir	0	1	
CRP mg/dL	n.a.	116 (85.75; 188)	
WHO Ordinal scale 1	2		
WHO Ordinal scale 2	15		
WHO Ordinal scale 5		6	
WHO Ordinal scale 6		2	
WHO Ordinal scale 8		5	

expression (one component of ISGF3 and GAS complexes) was evaluated. An increased IRF9 expression was found in CD8⁺ T cells, IgD⁺CD27⁻, IgD⁺CD27⁺, IgD⁻CD27⁺, and IgD⁻CD27⁻ B cells, PB and CD14⁺ cells from patients with mild COVID-19 compared to healthy controls (Fig. 2B, C). Similar to STAT1, severe COVID-19 was characterized by reduced IRF9 expression compared to mild COVID-19, in PB and CD14⁺ cells (Fig. 2 A-C). Patients with severe COVID-19 had lower IRF9 expression compared to mild cases, consistent with a reduced STAT1 expression.

Regarding the expression of IRF1, a molecule well known to directly bind and impact the ISRE [12], we found no difference between healthy controls and patients with COVID-19 irrespective of severity in T cells, and IgD⁺CD27⁻, IgD⁺CD27⁺, IgD⁻CD27⁺, and IgD⁻CD27⁻ B cells while in CD14⁺ monocytes and plasmablasts, IRF1 was significantly increased among patients with mild or severe COVID-19 compared to healthy controls (Fig. 2D-F).

Expression of intracellular phosphorylated (pS477/pS479) IRF7 did not significantly differ between all groups studied and between the different T- and B-cell populations (Fig. 2G-I). Only in monocytes, IRF7 was reduced in severely affected COVID-19 patients compared to mild cases and healthy controls.

Correlation of STAT1 with IFN signature

We wondered how these findings interrelate especially with regard to the IFN-signature, which was assessed by the expression of the surrogate marker Siglec-1 (CD169) on monocytes [16]. In our cohort, we observed a significant reduction of Siglec-1 expression in severely affected COVID-19 patients (Fig. 3A). Siglec-1 and STAT1 showed a significant correlation among CD3⁺ T cells, CD19⁺ B cells, and monocytes (Fig. 3B), while pSTAT1 did not significantly correlate with Siglec-1 as a surrogate for IFN signature or age (Fig. 3C). Also, STAT1 and IRF9 both components of the ISGF3 did not correlate (Fig. 3C).

Reduced STAT1 response upon IFN stimulation in severe COVID-19

To further evaluate the functionality of type I and II IFN signaling in the context of our finding of reduced baseline whole protein expression of STAT1, we stimulated PBMCs of healthy controls, mildly and severely affected COVID-19 patients with low doses of either IFN- α or IFN- γ for 48 h. As a control unstimulated cells (RPMI) of each group were used. Stimulation with IFN- α led to a transcriptional upregulation of STAT1 in CD3⁺ T cells and CD19⁺ B cells in healthy controls and in mild COVID-19 cases in CD19⁺ B cells (Fig. 4A). In severe COVID-19 cases, a tendency of upregulation of STAT1 was observed (Fig. 4A). The phosphorylation of STAT1 after low-dose IFN- α or IFN- γ stimulation for 48 h remained unchanged in healthy controls and mildly affected COVID-19 patients, while it was enhanced in severely affected COVID-19 patients already in unstimulated cells and without further increase after 48 h incubation with IFN- α or IFN- γ (Fig. 4B).

As expected, a persistent increase of STAT1 expression in CD3⁺ and CD19⁺ cells from COVID-19 patients (both mild and severe) compared to controls was observed in short-term culture (5 min, Fig. 4C). The short-term stimulation with higher doses of IFN- α was able to increase pSTAT1 in CD3⁺ from controls but not in COVID-19 cases (Fig. 4D). Also, higher pSTAT1 expression was seen in patients with severe COVID-19 compared to patients with mild COVID-19 and controls in unstimulated cultures and IFN- γ stimulated cultures but not in IFN- α stimulated cultures in CD3⁺ cells (Fig. 4D). IFN- γ stimulation did not impact STAT1 phosphorylation (Fig. 4D, E).

Discussion

COVID-19 is characterized by excessive production of multiple proinflammatory cytokines [17, 18] and patients with severe COVID-19 have a highly impaired IFN type I signature, in

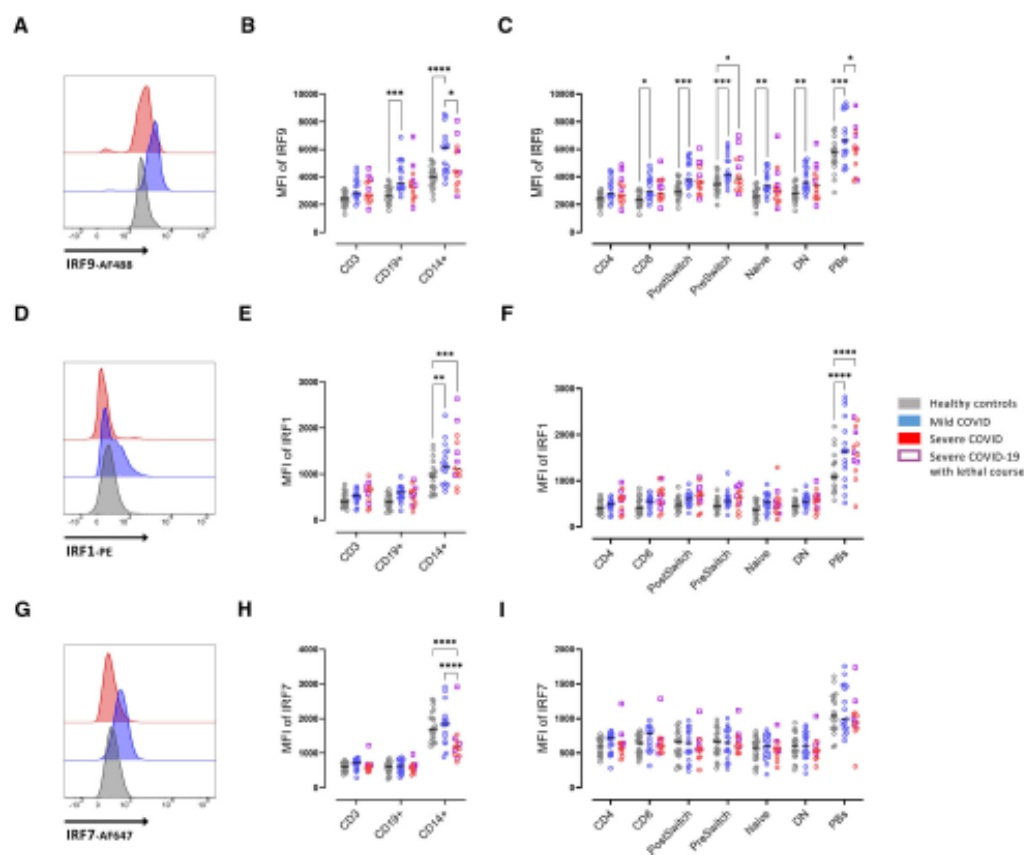


Figure 2. Enhanced intracellular IRF9 expression in severe COVID-19. (A) Representative histograms of baseline expression of IRF9 on B cells from healthy controls (grey), mild (blue), and severe (red) COVID-19 patients. (B) Median fluorescence intensity (MFI) of IRF9 in CD3+, CD19+, and CD14+ cells. (C) MFI of IRF9 in T- and B-cell subsets (as described in Fig. 1B). (D) Representative histograms of baseline expression of IRF1 on B cells healthy controls (grey), mild (blue) and severe (red) COVID-19 patients. (E) MFI of IRF1 in CD3+, CD19+, and CD14+ cells. (F) MFI of IRF1 in T- and B-cell subsets (as described in Fig. 1B). (G) Representative histograms of baseline expression of IRF7 on B cells from healthy controls (grey), mild (blue), and severe (red) COVID-19 patients. (H) MFI of IRF7 in CD3+, CD19+, and CD14+ cells. (I) MFI of IRF7 in T- and B-cell subsets (as described in Fig. 1B). Median and data from healthy controls (n = 20), mild COVID-19 (n = 17), and severe COVID-19 (n = 13) patients. (A–I) Data shown are representative from nine independent experiments. Two-way ANOVA with Sidack post-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001. Deceased patients are indicated as purple quadrats

particular, reduced IFN- α production and activity [6]. A common signaling route of cytokines including IFNs is the JAK/STAT signaling pathway [19]. JAKs and STATs provide a highly complex but orchestrated system of heterogeneous molecules with specific signaling through defined receptor complexes including recruitment of different STATs and resulting in specific downstream transcription [7].

In this study, we describe an upregulation of STAT1 and IRP9 in mildly and severely affected COVID-19 patients, which correlated with the IFN-signature reflected by Siglec-1 surface expression. Both Siglec-1 and STAT1 were lower among severely affected COVID-19 patients compared to mildly affected COVID-

19 patients, especially in plasmablasts and monocytes. This is of particular interest since, these cells are considered the main players of pathogenesis in severe COVID-19 [20, 21]. The data suggest that certain viral factors may limit proper STAT1 and IRP9 function in severe COVID-19 patients in these cells and that the inhibition of translocation of STATs is more pronounced than the inhibition of phosphorylation [13, 14]. An alternative explanation is that some individuals react differently to the same viral load, resulting in the detrimental alterations of pSTAT1/IRP9. These results are in accordance with other authors, showing Siglec-1 expression correlates with viral load in mild COVID patients, but not in severe COVID patients [22].

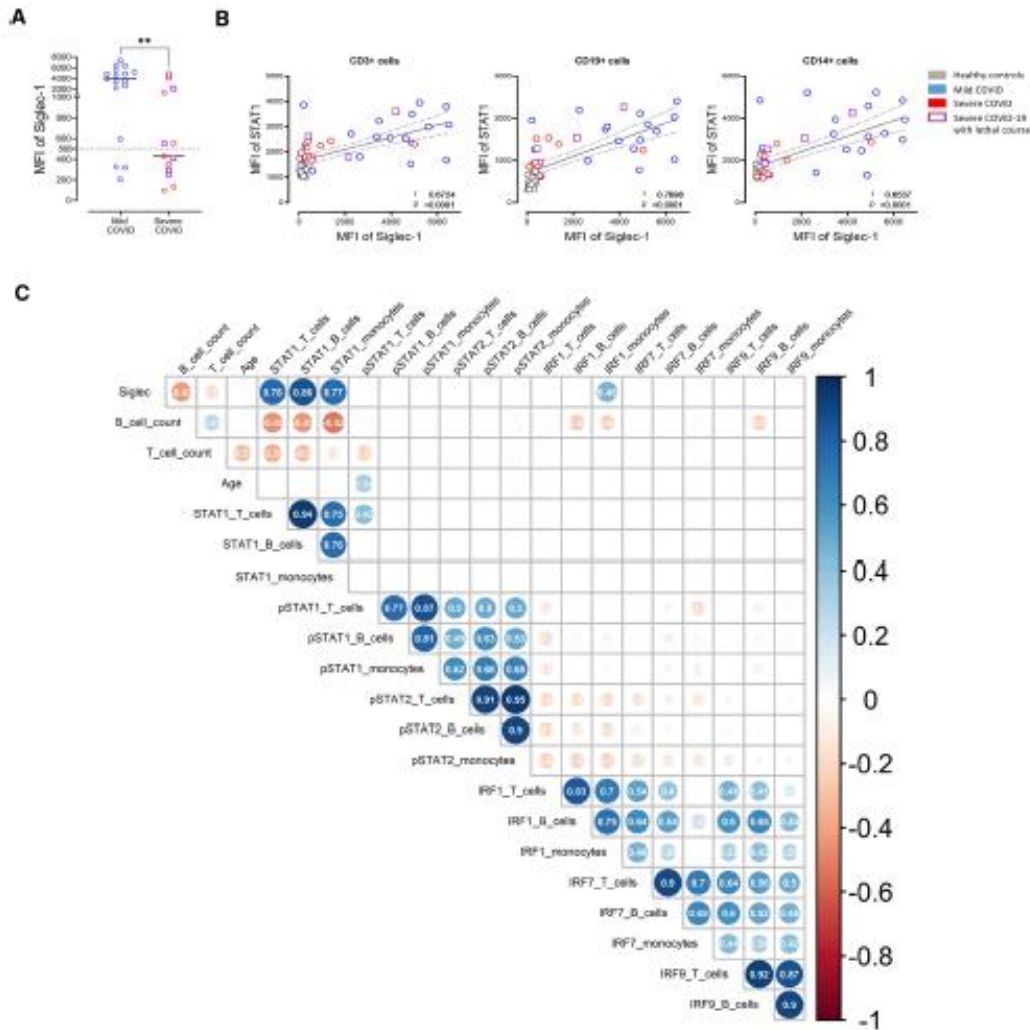


Figure 3. Significant correlation of STAT1 and Siglec-1 (CD169). (A) Siglec-1 (CD169) expression on CD14+ monocytes in mild and severe COVID-19 patients. (B) Correlation of Siglec-1 expression on the surface of CD14+ monocytes with intracellular STAT1 expression in CD3+ T cells, CD19+ B cells, or CD14+ monocytes. Each point represents a donor. Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) Spearman's correlation matrix showing the correlation of all investigated parameters (STAT1, pSTAT1, pSTAT2, IRF1, IRF7, and IRF9) in relation to the analyzed cell populations (B cells, T cells, and monocytes). Corresponding correlations are represented by red (negative) or blue (positive) circles. Size and intensity of color refer to the strength of correlation. Data from healthy controls ($n = 20$), mild COVID-19 ($n = 17$), and severe COVID-19 ($n = 13$) patients. (A–C) Data shown are representative from nine independent experiments. Only correlations with $p \leq 0.05$ are indicated. Deceased patients are indicated as purple quadrats

Increased levels of STAT1 in B cells were previously reported in SLE patients that correlate with Siglec-1 expression on CD14+ monocytes [23]. In a similar way, SLE patients have increased levels of the STAT1 protein in CD4+ T cells, alteration associated with perturbed homeostasis of Treg and disease severity [24]. Discordant to the whole protein levels, the phosphorylation

of STAT1 is enhanced in severely affected COVID-19 patients suggesting a dysbalanced JAK/STAT signaling that fails to induce transcription of the ISRE. An increased pSTAT1 is also present without stimulation in cultured PBMCs (here CD19+ B cells and CD3+ cells) and no further increase by IFN- α or IFN- γ stimulation is achieved. Further, this intervention could not

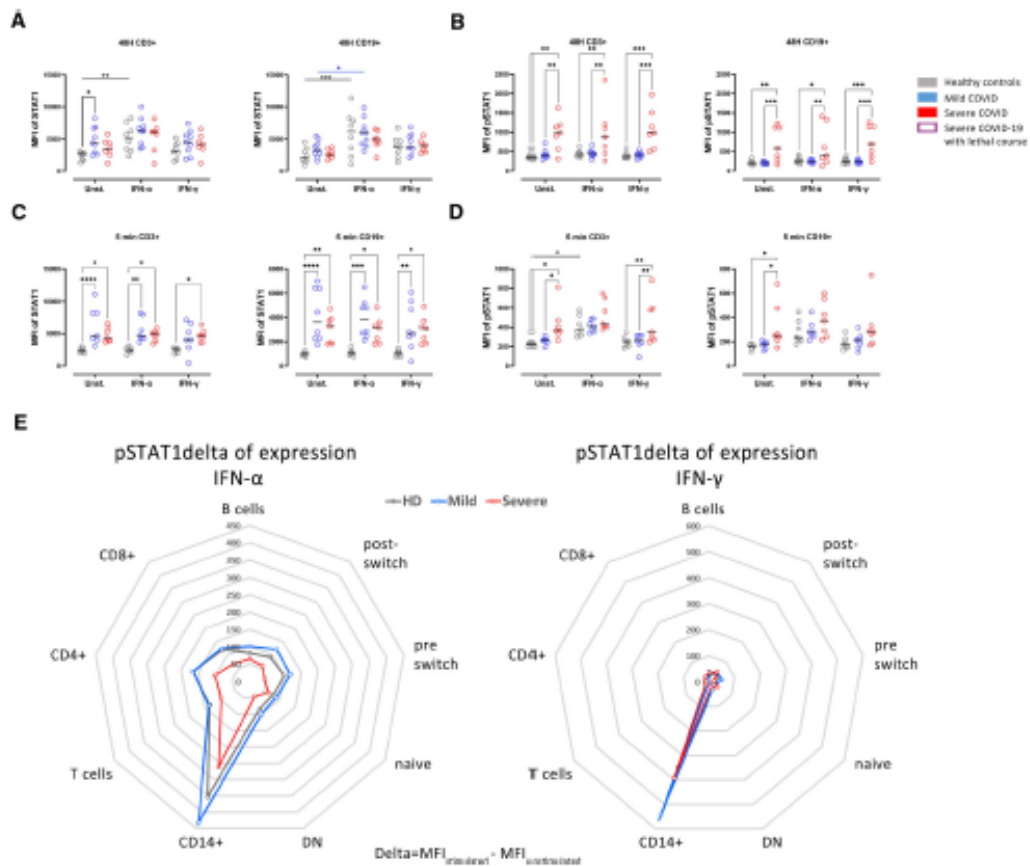


Figure 4. Attenuated pSTAT1 response upon IFN type I and II stimulation in severe COVID-19. (A) STAT1 and (B) pSTAT1 expression in CD3+ T cells and CD19+ B cells in culture of PBMCs from healthy controls (grey, n = 8), mild (blue, n = 9), or severe (red, n = 7) COVID-19 patients. Cells were stimulated for 48 h with either IFN-α (5 ng/mL) or IFN-γ (5 ng/mL), or only RPMI as a control. (C) STAT1 and (D) pSTAT1 expression in PBMCs of the same donors as in (A) stimulated with IFN-α (100 ng/mL) or IFN-γ (100 ng/mL) for 5 min. (E) Delta of pSTAT1 expression in cell populations after stimulation with IFN-α (left) or IFN-γ (right) for 5 min in the three study groups. Untreated control values of pSTAT1 were subtracted to show the individual increase of STAT1 phosphorylation. Data are presented as radar diagrams. Two-way ANOVA with Sidack post-test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001

demonstrate a transcriptional increase of STAT1 which would indicate reversibility of this condition. Interestingly, high expression of unphosphorylated STAT2 and IRF9 leads to enhanced IL-6 expression in response to NF-κB activators [25], which could be relevant for proper response in COVID-19, compromised in severe patients.

Interestingly, phosphorylation of STAT1 in response to IFN stimulation can persist for hours, but newly synthesized unphosphorylated STAT1 induced by pSTAT1 can persist for several days [26]. This suggests high levels of unphosphorylated STAT1 in COVID patients were synthesized in response to persistent type I IFN signaling. It is worth to note that cells treated with lenivivus which exhibited an increase in STAT1, did not completely phos-

phorylate in response to IFN stimulation [27]. The role of STAT1 is not completely dependent on phosphorylation [26, 27], which suggests a role of alternative unphosphorylated STAT1-mediated pathways in COVID-19.

The reduced Siglec-1 expression on the surface of CD14+ monocytes of patients suffering from severe COVID-19 compared to patients with mild COVID-19 is consistent with published data [28–30]. As a result of this finding and efficient analysis of Siglec-1 on CD14+ cells, we started to routinely measure Siglec-1 in all patients with COVID-19 admitted to ICUs to distinguish between patients with high and low IFN signature to test the hypothesis of an association of IFN signature and outcome of the patients.

The absence of correlation between STAT1 and pSTAT1 with IRF9, suggests that an alternative IRF9 independent signaling [12] could have a role in COVID-19. Previously, it was reported for IRF9 knockout mice that type I IFN mediates a potent inflammatory response associated with a more severe neurological disease [31]. Varicella zoster virus prevents type I IFN response reducing IRF9 and inhibition of STAT2 phosphorylation in infected cells [32]. IRF9 also prevents exhaustion of CD8+ T cells in lymphocytic choriomeningitis infection [33]. Interestingly, SARS-CoV-2 spike transfected cells secrete miR-148a and -590 via exosomes which induce degradation of IRF9 in human microglia [34].

Currently, optimal treatment for patients with COVID-19 is still uncertain and both interventions, blocking of IFN signaling by JAK/STAT inhibition [35, 36] or the use of different types of IFN as substitutions, have been suggested as a treatment for COVID-19 and showed efficacy in small clinical trials [37, 38]. Thus, the key question raises which intervention is appropriate for which patient? In patients with high IFN signaling that are likely in an early stage of the disease, inhibition strategies appear to be attractive especially during the phase of cytokine storm. On the other hand, patients with an inability to increase antiviral response are likely in severe stage of disease, IFN substitution may hold more promise than further inhibition.

The current data indicate severe impairment of STAT1 and IRF9 in severely infected COVID-19 patients consistent with inappropriate type IFN upregulation as a potential mechanism for enhanced disease severity. It appears of utmost importance to understand the underlying mechanisms in more detail as patients with diminished type IFN response may benefit from targeted therapies. In this regard, JAK/STAT inhibition may hold promise for patients with higher STAT1 expression (mild cases), while patients with low Siglec-1 and unable inability to increase antiviral response may benefit from IFN substitution.

Methods

Study participants

Peripheral blood samples (EDTA anticoagulated vacutainer system, Becton Dickinson Biosciences, BD, NJ, USA) from 20 healthy controls and 30 COVID patients were analyzed, 17 with mild (WHO 8-point ordinal scale 1 and 2) and 13 with a severe course of the disease (WHO 8-point ordinal scale ≥ 4) [15]. Donor information is summarized in Table 1. Severe cases were participants in the CAPSID trial that investigated convalescent plasma therapy (EudraCT2020-001210-38; NCT04433910). Samples for this study were collected at baseline prior to administration of the investigation drug. All participants or their legal representatives gave written informed consent according to the approval of the ethics committee at the Charité University Hospital, Berlin (EA2/066/20 Pa-Covid-19) and University of Ulm (CAPSID trial (115/20 and 488/20) [39, 40].

Analytical methods and flow cytometry

All procedures adhered to guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies [41]. Intracellular phenotyping of STAT1, pSTAT1, pSTAT2, IRF1, and IRF7 levels in B and T cells was conducted as previously published [23]. Briefly, peripheral whole blood (500 μ L) was lysed and fixed the same day of acquisition using 5 mL BD phosflow lyse/fix buffer (BD, 10 min, 37°C) considering the manufacturer's protocol (mix of 1:5 in distilled aqua). After two washing steps using ice-cold PBS Dulbecco (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) (530 g, 8 min, 4°C), permeabilization was performed using 200 μ L BD Perm Buffer II (BD, 12h, -20°C), followed by overnight storage at -20°C. Next, cells were washed twice with PBS Dulbecco containing 0.5% BSA/EDTA (530 \times g, 8 min, 4°C) and resuspended in 50 μ L of PBS with 20% Brilliant buffer (BD). After incubation with 2.5 μ L of FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, NRW, Germany) for 5 min, staining for 1 h and subsequent flow cytometry analysis were carried out on the same day.

All flow cytometry analyses were performed using a BD FACS Fortessa (BD). To ensure comparable MFIs overtime of the analyses, Cytometer Setup and Tracking beads (BD) and Rainbow Calibration Particles (BD) were used. For flow cytometric analysis, the following fluorochrome-labeled antibodies were used: BUV395 anti-CD14 (BD, clone M5E2, 1:50), PE-Cy7 anti-CD3 (BD, clone UCHT1, 1:100), BV510 anti-CD4 (BD, clone SK3, 1:50), BUV737 anti-CD8 (BD, clone SK1, 1:500), BV711 anti-CD19 (BD, clone SJ25C1, 1:25), BV421 anti-CD20 (BD, clone 2H7, 1:25), BV786 anti-CD27 (BD, clone L128, 1:50), PE-CP594 anti-IgD (Biolegend, CA, USA, clone IA6-2, 1:500) for basic immunophenotyping of cell populations of interest. Quantitative analysis was done using the following intracellular fluorochrome-labeled antibodies: PE anti-STAT1 (BD, clone 1/Stat1, 1:10), FITC anti-pSTAT1 (BD, clone 4a, 3:20), AF647 anti-pSTAT2 (R&D Systems, MN, USA clone 1021D, 1:5), PE anti-IRF1 (BD, clone 20/IRF-1, 1:20), AF647 anti-IRF7 (BD, clone K47-671, 1:10). For IRF9 and STAT2 analysis, an unconjugated IRF9 antibody (Thermo Fisher, OH, USA isotype rabbit IgG, clone 14H9L22, 1:100) or STAT2 antibody (Cell signaling, PA, USA) was applied. After staining and washing cells, a secondary antibody was used for specific binding of IRF9 or STAT2 (Jackson ImmunoResearch, PA, USA, isotype donkey anti-rabbit IgG, polyclonal, 1:100). Number of absolute B cells was measured with Trucount (BD) and samples were processed according to the manufacturer's instruction. As a control, at least one healthy control sample was processed simultaneously with patients' samples. Siglec-1 (CD169) expression analysis on CD14+ monocytes was performed at baseline as previously described [42].

Isolation of PBMCs

PBMCs were obtained by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, IL, USA).

Functional analysis of IFN- α and IFN- γ signaling pathways

To evaluate the functional cellular responsiveness upon IFN stimuli, stimulation experiments were carried out as previously described [23]. In brief, we suspended isolated PBMCs in RPMI medium (GibcoMAX, Life Technologies, Paisley, UK) and stimulated with IFN- α 2a (100 ng/mL for 5 min and 5 ng/mL 48 h) (Recombinant Human) or IFN- γ 1b (100 ng/mL for 5 min and 5 ng/mL 48 h) (Recombinant Human, Milteny). Cells were then harvested, washed, lysed, permeabilized, and stained using the same staining as mentioned above followed by flow cytometry.

Statistical analysis

Flow cytometry data were analyzed using FACSDiva software (BD) and FlowJo vX (TreeStar, OR, USA). For graphical and statistical analysis, GraphPad Prism (version 7.00, GraphPad Software, CA, USA) was used. Mann-Whitney tests were used for the comparison of two groups. For multiple group comparison, two-way ANOVA with Sidák's post-test for multiple comparison. Spearman correlation coefficient was calculated to detect possible associations between parameters or disease activity, respectively. *p*-values less than 0.05 were considered significant. Correlation matrix was calculated using base R and corplot package (R Foundation for Statistical Computing) using Spearman method.

Ethics Statement

This study was carried out in accordance with the recommendations of the ethics' committees at the Charité University Hospital Berlin and University of Ulm with written informed consent from all subjects.

Patient consent statement

All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, according to the authorization of the local Ethical Committee.

Acknowledgements: ES was funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBWF) Grant BCOVIT, 01KI20161. ES received a grant by the Berlin Institute of Health with the Charité Clinician Scientist Program funded by the Charité – Universitätsmedizin Berlin and the Berlin Institute of Health. ALS is funded by a scholarship of the German Society of Rheumatology. TD is grantholder of the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants KO 2270/7 1, KO-2270/4-1 (KK); Do491/7-5, 11-1, Tran-

sregio 130 TP24. HRA holds a scholarship of the COLCIENCIAS scholarship No. 727, 2015. The CAPSID trial was funded by the German Federal Ministry of Health (Bundesministerium für Gesundheit) to HS and SK.

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions: ES, AA, JR, DK, DZ, and LS enrolled patients and collected samples. HR, ES, FSZ, LS, and AA analyzed the data. SK and HS provided patients within the clinical trial. KUE, TD, AL, ES, and HS supervised the work and acquired funding. All authors developed, read, and approved the current manuscript.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Peer review: The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/eji.202149575>.

References

- Platanias, L. C., Mechanisms of type-I- and type-II-Interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. 5: 375–386.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. and Ugolini, S., Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 2008. 9: 503–510.
- Bonjardim, C. A., Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses—and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect.* 2005. 7: 569–578.
- Bastard, P., Rosen, L. B., Zhang, Q., Michailidis, E., Hoffmann, H. H., Zhang, Y., Dorgham, K. et al., Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020. 370: eabd4585.
- Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M. et al., Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020. 370: eabd4570.
- Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabet, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Pera, H. et al., Impaired type I Interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 2020. 369: 718–724.
- Shuai, K., Ziemlecki, A., Wilks, A. F., Harpur, A. G., Sadowski, H. B., Gilman, M. Z. and Darnell, J. E., Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of JAK and STAT proteins. *Nature* 1993. 366: 580–583.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. and Stark, G. R., JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. *Science* 1994. 264: 1415–1421.
- Banninger, G. and Reich, N. C., STAT2 nuclear trafficking. *J. Biol. Chem.* 2004. 279: 39199–39206.
- Paul, A., Tang, T. H. and Ng, S. K., Interferon regulatory factor 9 structure and regulation. *Front. Immunol.* 2018. 9: 1831.
- Platanias, E., Demiroz, D., Schneller, A., Fischer, K., Capello, C., Hartl, M., Gossenreiter, T. et al., A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nat. Commun.* 2019. 10: 2921.
- Michalaska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J. and Bluyssen, H. A. R., A positive feedback amplifier circuit that regulates Interferon (IFN)-stimulated gene

- expression and controls Type I and Type II IFN responses. *Front. Immunol.* 2018. 9: 1135.
- 13 Wu, Y., Ma, L., Zhuang, Z., Cai, S., Zhao, Z., Zhou, L., Zhang, J. et al., Main protease of SARS-CoV-2 serves as a bifunctional molecule in restricting type I Interferon antiviral signaling. *Signal Transduct Target Ther.* 2020. 5: 221.
 - 14 Lei, X., Dong, X., Ma, R., Wang, W., Xiao, X., Tian, Z., Wang, C. et al., Activation and evasion of type I Interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* 2020. 11: 3810.
 - 15 Dodd, L. E., Follmann, D., Wang, J., Koenig, F., Korn, L. L., Schoergenhofer, C., Proschan, M. et al., Endpoints for randomized controlled clinical trials for COVID-19 treatments. *Clin. Trials* 2020. 17: 472–482.
 - 16 Biesen, R., Demir, C., Barkhudarova, F., Grun, J. R., Steinbrich-Zolner, M., Backhaus, M. et al., Stalk acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008. 58: 1136–1145.
 - 17 Lucas, C., Wong, P., Klein, J., Castro, T. B. R., Silva, J., Sundaram, M., Ellingson, M. K. et al., Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 2020. 584: 463–469.
 - 18 Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., Manson, J. J. and HLH Across Specialty Collaboration, U.K., COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020. 395: 1033–1034.
 - 19 Salas, A., Hernandez-Rocha, C., Duijvestein, M., Paulson, W., McGovern, D., Vermeire, S., Vetrano, S. et al., JAK-STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2020. 17: 323–337.
 - 20 Ferreira-Comes, M., Kruglov, A., Durak, P., Hehrlich, F., Tizian, C., Helzlsouer, G. A., Pascual-Saguant, A. et al., SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF-beta-dominated chronic immune response that does not target itself. *Nat. Commun.* 2021. 12: 1961.
 - 21 Kosyryova, A., Dzhalilova, D., Lokhotina, A., Vishnyakova, P. and Patkhudinov, T., The role of macrophages in the pathogenesis of SARS-CoV-2-associated acute respiratory distress syndrome. *Front. Immunol.* 2021. 12: 682871.
 - 22 Doehn, J. M., Tabelling, C., Biesen, R., Saccomanno, J., Madlung, E., Pappo, E., Gabriel, F. et al., CD169/SIGLEC1 is expressed on circulating monocytes in COVID-19 and expression levels are associated with disease severity. *Infection* 2021. 49: 757–762.
 - 23 Aue, A., Szellinski, F., Weissenberg, S. Y., Wiedemann, A., Rose, T., Lino, A. C. and Dornar, T., Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 2020. 59: 3435–3442.
 - 24 Goropovsek, A., Gorenjak, M., Gradisnik, S., Dal, K., Holc, I., Hojs, R., Krajnc, I. et al., Increased levels of STAT1 protein in blood CD4 T cells from systemic lupus erythematosus patients are associated with perturbed homeostasis of activated CD45RA(-)FOXP3(hi) regulatory subset and follow-up disease severity. *J. Interferon Cytokine Res.* 2017. 37: 254–268.
 - 25 Nan, J., Wang, Y., Yang, J. and Stark, G. R., IRF9 and unphosphorylated STAT2 cooperate with NF-kappaB to drive IL6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. 115: 3906–3911.
 - 26 Lehtonen, A., Matikainen, S. and Julkunen, I., Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *J. Immunol.* 1997. 159: 794–803.
 - 27 Cheon, H. and Stark, G. R., Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of Interferon-induced immune regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. 106: 9373–9378.
 - 28 Ortilon, M., Coudereau, R., Cour, M., Rimmel, T., Godignon, M., Gossez, M., Yonis, H. et al., Monocyte CD169 expression in COVID-19 patients upon intensive care unit admission. *Cytometry A* 2021. 99: 466–471.
 - 29 Bourgoin, P., Soliveres, T., Barbarost, A., Loundou, A., Belkacem, I. A., Arnoux, I., Bernot, D. et al., CD169 and CD64 could help differentiate bacterial from COVID-19 or other viral infections in the Emergency Department. *Cytometry A* 2021. 99: 435–445.
 - 30 Bodin, A. S., Maitinson, A., Picot, M. C., Mennechet, F., Malergue, F., Pison, A., Nytramigisha, E. et al., Monocyte CD169 expression as a biomarker in the early diagnosis of coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis.* 2021. 223: 562–567.
 - 31 Hofer, M. J., Li, W., Lim, S. L. and Campbell, I. L., The type I Interferon-alpha mediates a more severe neurological disease in the absence of the canonical signaling molecule Interferon regulatory factor 9. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2010. 30: 1149–1157.
 - 32 Verweij, M. C., Wellish, M., Whitmar, T., Malouf, D., Lapal, M., Jonjic, S., Haas, J. G. et al., Varicella viruses inhibit interferon-stimulated JAK-STAT signaling through multiple mechanisms. *PLoS Pathog.* 2015. 11: e1004901.
 - 33 Huber, M., Suprunenko, T., Ashhurst, T., Marbach, F., Ralfer, H., Wolff, S., Streckler, T. et al., IRF9 prevents CD8(+) T cell exhaustion in an extrinsic manner during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 2017. 91: e01219-17.
 - 34 Mishra, R. and Banerjee, A. C., SARS-CoV-2 spike targets USP33-IRF9 axis via exosomal miR-148a to activate human microglia. *Front. Immunol.* 2021. 12: 656700.
 - 35 Hayek, M. E., Mansour, M., Ndetan, H., Burkes, Q., Corkren, R., Dulle, A., Hayek, R., Parvez, K. and Singh, S., Anti-inflammatory treatment of COVID-19 pneumonia with tofacitinib alone or in combination with dexamethasone is safe and possibly superior to dexamethasone as a single agent in a predominantly African American cohort. *Mayo Clin. Proc. Innov. Qual. Outcomes* 2021. 5: 605–613.
 - 36 Wijaya, I., Andhika, R., Huang, I., Purwiga, A., Budiman, K. Y., Bashari, M. H., Renarti, I. and Roesti, R. M. A., The use of Janus Kinase inhibitors in hospitalized patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Clin. Epidemiol. Glob. Health* 2021. 11: 100755.
 - 37 Hung, I. F., Lung, K. C., Tso, E. Y., Liu, R., Chung, T. W., Chu, M. Y., Ng, Y. Y. et al., Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2020. 395: 1695–1704.
 - 38 Andreacos, E. and Tsiodras, S., COVID-19: lambda Interferon against viral load and hyperinflammation. *EMBO Mol. Med.* 2020. 12: e12465.
 - 39 Kurth, F., Roennefarth, M., Thibeault, C., Corman, V. M., Müller-Rodetzky, H., Mittermaier, M., Ruvw-Glossenkamp, C. et al., Studying the pathophysiology of coronavirus disease 2019: a protocol for the Berlin prospective COVID-19 patient cohort (Pa-COVID-19). *Infection* 2020. 48: 619–626.
 - 40 Körper, S., Weiss, M., Zickler, D., Wiesmann, T., Zacharowski, K., Corman, V. M., Gröner, R. et al., High dose convalescent plasma in COVID-19: results from the randomized trial CAPSID. *medRxiv* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.05.10.21256192>
 - 41 Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W. et al., Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* 2019. 49: 1457–1973.
 - 42 Rosa, T., Szellinski, F., Lisnoy, A., Reiter, K., Fleischer, S. J., Burmester, G. R., Radbruch, A. et al., SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjogren's syndrome. *RMD Open* 2016. 2: e000292.

148 H. Rincon-Arevalo et al.

Eur. J. Immunol. 2022. 52: 138–148

Abbreviations: COVID-19: coronavirus disease 2019 · GAS: IFN- γ -activated site · ICU: intensive care unit · IFNAR: IFN- α receptor · IRF: IFN regulatory factor · ISGF3: interferon-stimulated gene factor 3 · ISRE: interferon stimulated response element · pSTAT: phosphorylated signal transducer and activator of transcription · RPMI: Roswell Park Memorial Institute · SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 · TYK2: Tyrosine Kinase 2

Full correspondence: Eva V. Schrezenmeier, MD, Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Chariteplatz 1, 10117 Berlin, Germany.
Email: eva-vanessa.schrezenmeier@charite.de

Received: 12/8/2021
Revised: 13/9/2021
Accepted: 13/10/2021
Accepted article online: 22/10/2021

Auszug aus der Journal Summary List (2022)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2022** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"Immunology"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 161 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
1	NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY	66,033	100.3	0.07444
2	Immunity	77,462	32.4	0.10298
3	NATURE IMMUNOLOGY	58,377	30.5	0.07154
4	Annual Review of Immunology	20,103	29.7	0.01519
5	Science Immunology	11,760	24.8	0.04142
6	Cellular & Molecular Immunology	13,869	24.1	0.02049
7	TRENDS IN IMMUNOLOGY	17,527	16.8	0.01833
8	Lancet HIV	5,796	16.1	0.01671
9	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE	70,263	15.3	0.05863
10	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	29,784	15.1	0.03582
11	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	60,069	14.2	0.05780
12	AUTOIMMUNITY REVIEWS	13,910	13.6	0.01330
13	Emerging Microbes & Infections	11,189	13.2	0.01885
14	JOURNAL OF AUTOIMMUNITY	11,240	12.8	0.01279
15	ALLERGY	24,704	12.4	0.02675
16	CLINICAL INFECTIOUS DISEASES	94,663	11.8	0.13925
17	EMERGING INFECTIOUS DISEASES	39,490	11.8	0.04703
18	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	23,254	10.9	0.04859
19	Cancer Immunology Research	12,883	10.1	0.01987
20	Journal of Allergy and Clinical Immunology-In Practice	13,968	9.4	0.03056
21	Journal of Neuroinflammation	26,022	9.3	0.02759

Druckexemplar der *Publikation 2*

Elevated unphosphorylated STAT1 and IRF9 in T and B cells of primary sjögren's syndrome: Novel biomarkers for disease activity and subsets.

Ritter J, Szelinski F, Aue A, Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Chen Y, Nitschke E, Dang VD, Wiedemann A, Schrezenmeier E, Lino AC, Dörner T.

J Autoimmunity. 2024 May 23:147:103243.

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2024.103243>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

Elevated unphosphorylated STAT1 and IRF9 in T and B cells of primary sjögren's syndrome: Novel biomarkers for disease activity and subsets

Jacob Ritter^{a,b,c}, Franziska Szelinski^{a,b}, Arman Aue^{b,d}, Ana-Luisa Stefanski^{a,b}, Hector Rincon-Arevalo^{a,b,d,e}, Yidan Chen^{a,b}, Eduard Nitschke^{a,b}, Van Duc Dang^{a,b}, Annika Wiedemann^{a,b}, Eva Schrezenmeier^{b,c,d}, Andreia C. Lino^{a,b}, Thomas Dörner^{a,b,*}

^a Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charitéplatz 1, 10117, Berlin, Germany

^b German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Gesellschaft, Berlin, Germany

^c Berlin Institute of Health at Charité – Universitätsmedizin Berlin, BIH Academy, Charitéplatz 1, 10117, Berlin, Germany

^d Department of Nephrology and Intensive Care, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charitéplatz 1, 10117, Berlin, Germany

^e Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

pSS
Interferon
B cells
T cells
STAT1
Subgroups

ABSTRACT

Objectives: Autoreactive B cells and interferon (IFN) signature are hallmarks of primary sjögren's syndrome (pSS), but how IFN signaling pathways influence autoantibody production and clinical manifestations remain unclear. More detailed studies hold promise for improved diagnostic methodologies and personalized treatment.

Methods: We analyzed peripheral blood T and B cell subsets from 34 pSS patients and 38 healthy donors (HDs) at baseline and upon stimulation regarding their expression levels of type I and II IFN signaling molecules (STAT1/2, IRF1, IRF9). Additionally, we investigated how the levels of these molecules correlated with serological and clinical characteristics and performed ROC analysis.

Results: Patients showed elevated IFN pathway molecules, including STAT1, STAT2 and IRF9 among most T and B cell subsets. We found a reduced ratio of phosphorylated STAT1 and STAT2 in patients in comparison to HDs, although B cells from patients were highly responsive by increased phosphorylation upon IFN stimulation. Correlation matrices showed further interrelations between STAT1, IRF1 and IRF9 in pSS. Levels of STAT1 and IRF9 in T and B cells correlated with the IFN type I marker Siglec-1 (CD169) on monocytes.

High levels of STAT1 and IRF9 within pSS B cells were significantly associated with hypergammaglobulinemia as well as anti-SSA/anti-SSB autoantibodies. Elevated STAT1 levels were found in patients with extraglandular disease and could serve as a biomarker for this subgroup ($p < 0.01$). Notably, IRF9 levels in T and B cells correlated with EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI).

Conclusion: Here, we provide evidence that in active pSS patients, enhanced IFN signaling incl. unphosphorylated STAT1 and STAT2 with IRFs entertain chronic T and B cell activation. Furthermore, increased STAT1 levels candidate as biomarker of extraglandular disease, while IRF9 levels can serve as biomarker for disease activity.

1. Introduction

Primary sjögren's syndrome (pSS) is a chronic autoimmune disease, defined by lymphocyte infiltration of salivary and lacrimal glands leading to sicca symptoms and substantial systemic disease burden. Besides glandular involvement, pSS patients can develop systemic manifestations and show an increased risk of developing B cell non-

Hodgkin's lymphoma [1]. The heterogeneity of symptoms and variable clinical courses require better characterization of patients including subsets to gain a deeper understanding of the disease and to facilitate individualized treatment strategies [2].

B lineage cell abnormalities, resulting in hypergammaglobulinemia and the presence of anti-nuclear antibodies (ANAs), in particular anti-SSA and anti-SSB are key findings indicating expansion and activity of

* Corresponding author: German Rheumatism Research Center (DRFZ) and Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charitéplatz 1, 10117, Berlin, Germany.
E-mail address: thomas.doerner@charite.de (T. Dörner).

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2024.103243>

Received 6 August 2023; Received in revised form 23 March 2024; Accepted 5 May 2024

Available online 24 May 2024

0896-8411/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

autoreactive B cells in patients with pSS [3,4]. In addition, T cell subsets play a role in pSS pathophysiology by producing pro-inflammatory cytokines, infiltrating salivary glands [5–7] and promoting formation of germinal centers (GC) [8]. However, the mechanisms of induction and maintenance of autoreactive T and B cell abnormalities in pSS remain largely unknown.

In terms of cytokine abnormalities, presence of IFN signature genes and activation of the IFN system is regarded as key mechanism in the pathogenesis of pSS [9]. Especially the overexpression of numerous IFN-inducible genes in salivary glands and peripheral immune cells from pSS patients [10,11] and their association with clinical characteristics [9,12] have been described. In this regard, Siglec-1 (CD169), a surrogate marker of type I IFN expression on CD14⁺ monocytes, was characterized as biomarker of extraglandular pSS manifestations [13,14].

Depending on the binding of either type I or type II IFN, different Janus kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT) signaling cascades are triggered (summarized in Fig. 1A). Type I IFN (i.e. IFN α) signals via binding to the IFN α -receptor chains, followed by the autophosphorylation of the associated JAK1/Tyk2 kinases. This leads to the formation of heterodimers of phosphorylated (p)STAT1/pSTAT2 which interact with interferon regulatory factor 9 (IRF9) [15]. This complex, called interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3), specifically binds IFN-stimulated response elements (ISRE). Type II IFN (i.e. IFN γ) signals via the IFN γ receptor, JAK1/JAK2 kinases subsequently forming homodimers of pSTAT1 [15,16]. Finally, interferon regulatory factor 1 (IRF1) is directly induced by both, type I and II IFN, and regulates multiple IFN-stimulated genes (ISGs) [17,18].

Apart from the conventional IFN triggered cascade of pSTATs, recent studies reported that long-term IFN exposure can lead to signaling activity of unphosphorylated (U-) STAT1, U-STAT2 and IRF9 [16,17]. In response to high levels of IFN, after the initially formed phosphorylated STAT1 decreased, U-STAT1 increase within 24h of IFN stimulation and prolong the IFN response for several days, increasing the expression of several IFN induced genes like IP144 and even STAT1 itself [19]. Furthermore, Cheon et al. showed that a prolonged exposure of cells to type I IFN induced the expression of U-STAT2 and IRF9, which together with U-STAT1 form the U-ISGF3 complex [19,20]. Interestingly, U-ISGF3 and U-STAT1 are capable of binding to DNA and itself able to drive IFN induced gene expression [19,21,22]. Following chronic long-term IFN exposure, U-STAT1 forms with U-STAT2 and IRF9 the U-ISGF3 complex and prolongs the expression of ISGs [21,22]. However, the influence of chronic IFN exposure and unphosphorylated IFN signaling in pSS patients is poorly understood.

Therefore, identification and characterization of involved molecules (e.g. STATs) including key transcription factors (e.g. IRFs, unphosphorylated STAT) in chronic inflammation like pSS holds promise to delineate cell type dependent IFN imprints and their relation to clinical subgroups.

So far, a limited number of studies characterized the cross-talk between pSS lymphocyte abnormalities, IFN signaling molecules and their phosphorylation status among peripheral T and B cell subsets. Since new therapy strategies targeting IFN and JAK/STAT are evolving [23–25], it appears crucial to better understand how IFN signaling may contribute to different pSS characteristics.

In this study, we investigated the relationship between clinical manifestations in pSS patients and functional abnormalities in T and B cell IFN signaling molecules. Therefore, we used a flow cytometry approach to analyze different downstream molecules of the IFN signaling pathway and assessed it in the context of clinical and serological characteristics. Elevated STAT1, STAT2 and IRF9 levels in pSS patients with extraglandular manifestations suggest chronic transcriptional activity of IFN pathways and may permit a distinction of pSS subgroups. Interestingly, IRF9 correlate with pSS disease activity measured by ESSDAI indicate that this molecule may serve as a novel biomarker for this disease.

2. Material and methods

2.1. Study participants and cohort definition

We collected peripheral blood samples (EDTA anti-coagulated, BD Vacutainer[®] system, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) from 34 pSS patients from our outpatient unit at the Department of Rheumatology and Clinical Immunology at Charité - Universitätsmedizin Berlin. All participants gave written informed consent, and the study has been approved by the ethics committee of the Charité - Universitätsmedizin Berlin (number of ethical approval EA4/051/17) in accordance with the declaration of Helsinki. The clinical, immunological and demographic data of the patients are summarized in Table 1 and Suppl. Table 1.

According to clinical manifestations, we subdivided our pSS patient cohort into two subgroups: one group with glandular sicca only (GL) and another group with additional extraglandular (BOL) manifestations. Both GL and BOL pSS subgroups fulfilled the ACR/EULAR criteria for pSS [26]. Whenever possible clinical and serological data was collected during the outpatient visit and disease activity index was assessed using ESSDAI score [27]. Our cohort included 13 glandular pSS patients with a mean ESSDAI of 3.0 and 21 extraglandular pSS patients with a mean ESSDAI of 7.2 (Table 1, Suppl. Table 1). Noteworthy, most patients were treated with hydroxychloroquine (HCQ) and/or low-dose prednisolone, 1 patient received azathioprine (Table 1).

2.2. Laboratory findings for correlation analysis

Autoantibodies (anti-nuclear antibody titer (ANA), anti-SSA/SSB, rheumatoid factor (RF) and IgG) were determined by routine diagnostic laboratory.

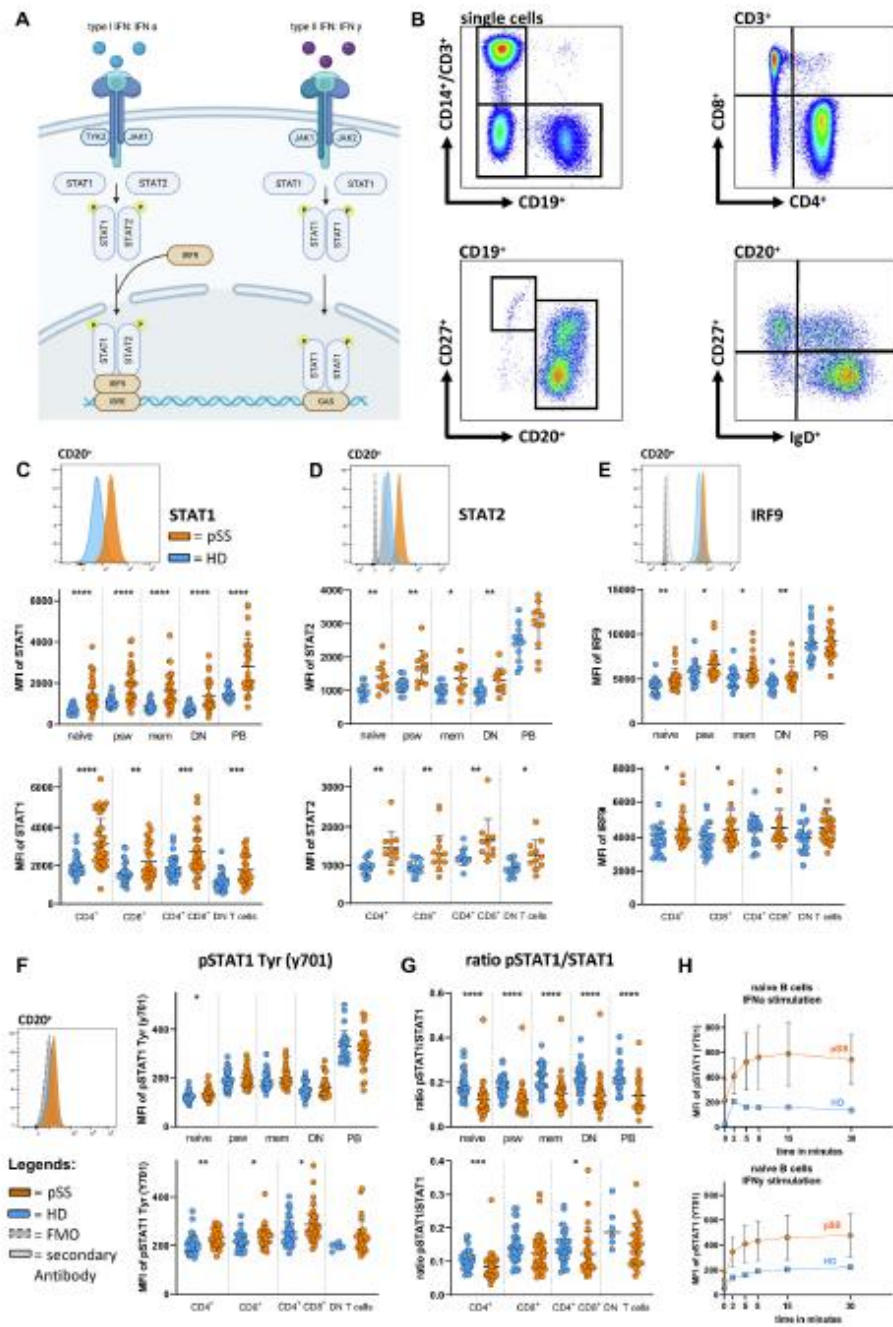
2.3. Intracellular staining

Intracellular stainings of STAT1, pSTAT1, STAT2, pSTAT2, IRF1 and IRF9 in T and B cells were performed as previously described [28,29]. Erythrolysis and fixation of peripheral whole blood was performed immediately after blood drawing using BD Phosflow Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, 10 min, 37 °C) according to manufacturer's instructions. After two washing steps permeabilization was performed using BD Perm Buffer II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA; 12 h, –20 °C), followed by overnight storage at –20 °C. On the following day, cells were washed twice and resuspended in Brilliant Buffer (BD Horizon, San Jose, CA, USA). After incubation with Fc γ blocking reagent (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, NRW, Germany) cells were stained (Suppl. Table 2). For IRF9 and STAT2 analysis, cells were incubated for 30 min with either unconjugated rabbit IRF9 antibody (Thermo Fisher, isotype rabbit IgG, clone 14H9L22, 1:100) or an unconjugated rabbit STAT2 antibody (Cell signaling, isotype rabbit IgG, clone D9J7L). After washing, cells were incubated with (AP400) donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (Jackson Immuno Research, isotype donkey anti-rabbit IgG, polyclonal, 1:100).

Flow cytometric analysis was performed using BD FACS LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Median fluorescence intensity of different markers was measured. As quality control, daily Cytometer Setup and Tracking beads (CST beads, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and Rainbow Calibration Particles (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) were used. As a control, at least one healthy control sample was included at each analysis.

2.4. Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from whole blood by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Chicago, IL, USA).



(caption on next page)

Fig. 1. STAT1 and IRP9 levels is increased in T and B lineage cells from pSS patients. (A) Scheme of the JAK/STAT signaling pathway of type I and type II interferon. (B) Representative gating strategy for the cell subsets analyzed: Naïve (naïve; IgD⁺CD27⁻), pre-switched (psw; IgD⁺CD27⁺), memory (mem; IgD⁻CD27⁺), double negative (DN; IgD⁻CD27⁻) B cells and plasmablasts (PB; CD20^{low}CD27⁺). CD4⁺ T cells; CD8⁺ T cells; CD4⁺CD8⁺ T cells and CD4⁻CD8⁻ double negative DN T cells. (C) Representative histogram for CD20⁺ B cells and median fluorescence intensity of STAT1, (D) STAT2, (E) IRP9 and (F) pSTAT1 (Y701) of T and B cell subsets obtained from HDs and patients with pSS. (G) Ratio of pSTAT1 (Y701) and STAT1 in T and B cells from HDs and patients with pSS. (H) MFI of pSTAT1 (Y701) among naïve B cells from HDs and patients with pSS after short term stimulation with IFN α and IFN γ . (HDs in blue, n = 38; pSS patients in orange, n = 34, (for STAT2, n = 11; for IRP9, n = 24, for IFN stimulation, pSS n = 5; HD n = 2). Graph (A) created with Biorender. Scatter plots represent means \pm SD; statistical significance was determined using two-tailed MWU (Mann Whitney U test) *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001, ****p \leq 0.0001. Representative histograms of molecules (blue/orange solid line), FMO (dashed line) and secondary antibody (light grey solid line) are shown.

Table 1
Demographic data of the patients with primary Sjögren's Syndrome.

	all pSS patients		Extraglandular (EGL)
	all pSS patients	pSS patients subgroups	
		Glandular only (GL)	
Individuals (n)	34	13	21
age, mean (range), years	57 (31–85)	62.2 (36–82)	52.1 (31–85)
female, n (%)	32 (94.1 %)	13 (100 %)	19 (95.2 %)
disease duration, mean (range) in years; (if available)	10.6 (2–33)	7.7 [2–13]	13.4 [3–33]
ESSDAI, mean extraglandular manifestations:	5.1	3	7.2
salivary gland involvement, n (%)	5 (14.7 %)	2	3
arthritis, n (%)	9 (26.5 %)	0	9
myositis, n (%)	0	0	0
leucocytoclastic vasculitis, n (%)	1 (2.9 %)	0	1
PNS symptoms, n (%)	2 (5.9 %)	0	2
Interstitial lung disease, n (%)	0	0	0
interstitial nephritis, n (%)	1 (2.9 %)	0	1
B cell lymphoma, n (also in the past)	2 (5.9 %)	0	2
medication at sampling:			
hydroxychloroquine, n (mean)	21 (215.3 mg)	8 (200 mg)	13 (230.8 mg)
prednisolone, n (mean)	10 (6.7 mg)	2 (5 mg)	8 (8.4 mg)
azathioprine, n (mean)	1 (50 mg)	0	1 (50 mg)
autoantibodies: n (%)			
ANA titre > 1:160; n (mean)	31 (1:2071)	11 (1:1207)	20 (1:2936)
anti-SSA	28 (82.3 %)	8 (61.5 %)	20 (95.2 %)
anti-SSB	15 (44.1 %)	1 (7.6 %)	14 (66.7 %)
anti-SSA positive and anti-SSB positive	15 (44.1 %)	1 (7.6 %)	14 (66.7 %)
RF IgA U/mL	139.2 (n = 33)	104.5 (n = 12)	173.8; (n = 21)
RF IgM U/mL	76.5; (n = 33)	15.2; (n = 12)	137.8; (n = 21)
gammaglobulines in serum in %	17.4; (n = 21)	12.7; (n = 8)	22.1; (n = 13)

Demographics, clinical courses, and laboratory status of the 34 patients enrolled. GL = glandular; EGL = extraglandular; ESSDAI = EULAR Sjogren's syndrome disease activity index; ANA = anti-nuclear antibody; RF = rheumatoid factor.

2.5. Short-term stimulation with IFN α and IFN γ

We evaluated the phosphorylation responsiveness in B cells upon IFN stimuli, stimulation experiments were carried out as previously described [29]. In summary, isolated PBMCs (1 Mio cells) were suspended in 100 μ l medium (GlutaMAX, Life Technologies, Paisley, UK) and stimulated with IFN- α 2a (100 ng/mL) (Recombinant Human) or

IFN- γ 1b (100 ng/mL) (Recombinant Human, Miltenyi) for each time-point separately. Stimulation was stopped after 2, 5, 8, 15 and 30 min by fixation. Cells were then harvested, washed, lysed, permeabilized, and stained using the same staining as mentioned followed by flow cytometric analysis.

2.6. Surface staining of Siglec-1 on CD14⁺ monocytes

Siglec-1 (CD169) expression on CD14⁺ monocytes, as a marker for type I IFN signature, was determined as previously described [14].

2.7. Identification of B and T cell subsets

B lineage cell subsets were identified as: conventional naïve (CD19⁺CD27⁻ IgD⁺); pre-switched memory (psw; CD19⁺CD27⁺ IgD⁺); conventional memory (mem; CD19⁺CD27⁺ IgD⁻); double negative (DN; CD19⁺CD27⁻ IgD⁻) B cells and plasmablasts (PB; CD19⁺CD20^{low}CD27⁺).

T cell subsets were identified as: CD4⁺ T cells (CD3⁺CD4⁺); CD8⁺ T cells (CD3⁺CD8⁺); CD4⁺CD8⁺ T cells (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) and CD4⁻CD8⁻ double negative T cells (CD3⁺CD4⁻CD8⁻). (Gating strategy in Fig. 1B, Suppl. Fig. 1A).

2.8. Statistical analysis

Descriptive statistics were used to describe the demographic features of the study participants. Flow cytometric data were analyzed using FACSDiva software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and FlowJo (version 10, TreeStar, Ashland, OR, USA). Graphical and statistical data analysis was performed using GraphPad Prism (version 9.00, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and R, including corplot package (R Foundation for Statistical Computing).

Statistical significance between two groups was determined using two-tailed Mann-Whitney-U (MWU) test. For multiple comparisons, Kruskal-Wallis test was used. Spearman correlation coefficient was calculated to detect possible correlations between readouts or disease activity and phenotypes. Unless stated otherwise, scatter and bar plots represent means \pm SD.

To determine sensitivity, specificity and cut off values for STAT1, receiver operating characteristics (ROC) curve analysis were employed. Area under the curve and statistically significant differences are reported.

Statistical significances were considered for p values less than 0.05 and are depicted in figures as: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

3. Results

3.1. Total STAT1/2 and IRP9 levels are increased in T and B cells from pSS patients

To investigate the status of IFN signaling in T and B cells of pSS patients, we measured total levels of STAT1, STAT2, IRP9 and IRF1 proteins as well as baseline phosphorylation of STAT proteins (pSTAT1 Y701, pSTAT2 Y690) in patients and healthy donors (HD) (Fig. 1).

In pSS patients, total STAT1 protein levels were elevated in all T and B cell subsets compared to HD (Fig. 1C). A similar finding was observed with regard to total STAT2 protein levels: besides plasmablasts, all other investigated T and B cell subsets showed higher levels in pSS patients compared to HD (Fig. 1D).

In a next step, we analyzed IRF1 and IRF9 levels as important transcription factors. Besides plasmablasts and CD4⁺ CD8⁺ T cells, we found elevated IRF9 in all T and B cell subsets in pSS patients compared to HD (Fig. 1E). Interestingly, we did not detect any difference between levels of IRF1 in T and B cells from patients and HDs (Suppl. Fig. S1B).

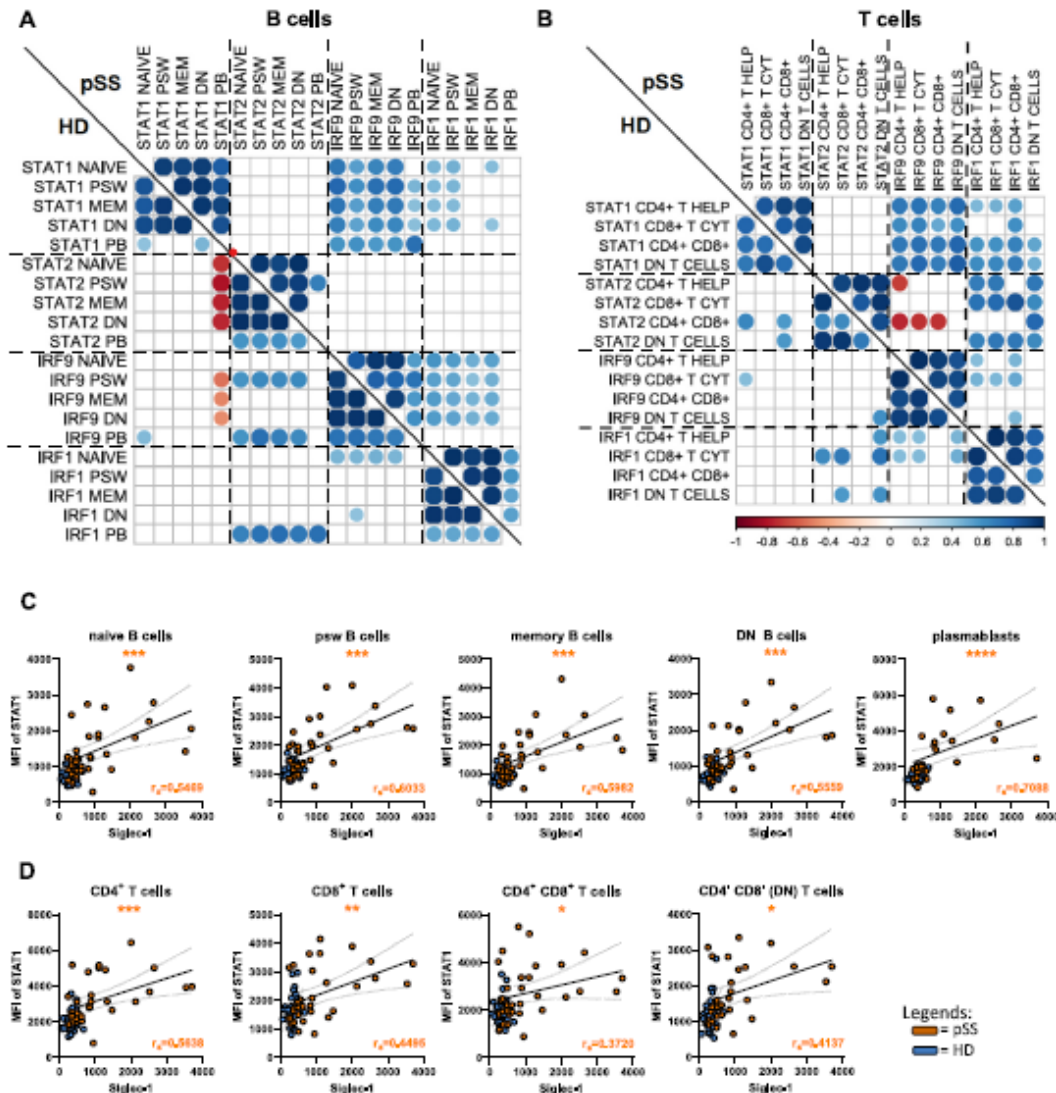


Fig. 2. STAT1 and IRF9 levels in T and B lineage cells of pSS patients correlate with IFN type I signature. (A) Correlation matrix depicting Spearman rho (positive correlation – blue, negative correlations – red) of STAT1, STAT2, IRF9 and IRF1 among B cell subsets of the pSS and HD cohort. Size and intensity of color refer to the strength of correlation (patients n = 34; HD n = 38). (B) Correlation matrix depicting Spearman rho (positive correlation – blue, negative correlations – red) of STAT1, STAT2, IRF9 and IRF1 in T cell subsets of the patient's and HD cohort (patients n = 34; HD n = 38). (C) STAT1 in B cells correlates with Siglec-1 expressed by CD14⁺ monocytes of pSS patients (orange). (D) STAT1 in T cell subsets correlates with Siglec-1 levels on CD14⁺ monocytes of pSS patients (orange). Spearman's rank test and coefficient (r) was calculated to identify correlations between the parameters. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001. (r) and *p are indicated only for patients (orange), HD plotted as reference. Correlation matrix depicting spearman rho (positive correlation – blue, inverse correlations – red), Size and intensity of color refer to the strength of correlation.

Furthermore, we did not find any influence of our patients' medication on the levels of STAT1, STAT2 and IRP9 in B cell subsets (Suppl. Fig. S2). Thus, elevated STAT1, STAT2 and IRP9 signaling proteins suggest activated IFN signaling across T and B cell subsets.

3.2. pSTAT1/2 proteins show discordant pattern compared with total STAT1/2

Since the classical signaling pathway results in phosphorylation of STAT proteins, we investigated phosphorylation sites of pSTAT1 Y701 and pSTAT2 Y690. Here, we found that levels of pSTAT1 (Y701) were elevated only in the naïve B cell subset, as well as in CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺ CD8⁺ T cells of pSS patients compared to HD, while there were no differences in other B cell subsets or DN T cells (Fig. 1F). With regard to pSTAT2 (Y690), we did not find any differences in the frequency in T or B cells of patients compared to HDs (Suppl. Fig. S1C).

As we observed elevated baseline STAT molecule levels but no clear differences in their baseline phosphorylation status, subsequent analyses compared ratios of pSTAT/STAT molecules to understand the relation between the levels of unphosphorylated and phosphorylated protein. We found a reduced ratio of pSTAT1/STAT1 in all B lineage cells as well as CD4⁺ and CD4⁺ CD8⁺ T cells in patients compared to HD (Fig. 1G). In contrast, the ratio of pSTAT2/STAT2 in T and B cells showed no difference between patients and HD with the only exception for CD4⁺ CD8⁺ T cells with a reduced ratio of pSTAT2/STAT2 in pSS (Suppl. Fig. S1D).

3.3. IFN pathway can be activated in pSS upon stimulation *in vitro*

IFN as an important cytokine in the disease pathophysiology and therefore assuming the chronic IFN exposure in pSS patients [30,31], we investigated the induction and responsiveness of STAT1 phosphorylation upon IFN α and IFN γ stimulation.

After short term IFN α and IFN γ stimulation we observed an increase of phosphorylated STAT1 (pSTAT1 Y701) in all analyzed B cells of pSS patients compared to HDs (Fig. 1H, Suppl. Figs. S1E and S1F) demonstrating that these cells remain responsive to IFN α and IFN γ stimulation.

In summary, our results show that IFN signaling baseline protein levels of STAT1, STAT2 and IRP9 of T and B cell subsets from pSS patients are elevated compared to HD while IRF1 showed no difference. Limited baseline alterations were found regarding the phosphorylation status while short-term stimulation was able to induce a pSTAT1 increase. The increased protein level of STAT1 suggests a long-term intrinsic imprinting by IFN on T and B cells in pSS patients.

3.4. STAT1 and IRP9 levels are co-regulated in T and B lineage cells of pSS patients and correlate with type I IFN signature

To analyze the relationship between levels of STAT1/2, IRP9 and IRF1 in different cell subsets, we analyzed the correlation between these proteins. The correlation matrices (Fig. 2A; Fig. 2B; Suppl. Figs. S3A and S3B) show different molecular patterns between HD and pSS patients highlighting an activated JAK/STAT signaling in patients.

In detail, levels of STAT1 and IRP9 were strongly associated across all investigated pSS T and B cell subsets (Fig. 2A and B; Suppl. Figs. S4A and S4D). Noteworthy, none of these correlations were found in HD T and B cell subsets. Interestingly, there was no correlation between STAT1 and STAT2 in pSS T and B cells or IRP9 and STAT2 within B cells (Fig. 2A and B).

Although IRF1 is not differentially expressed in pSS patients compared with HD (Suppl. Fig. S1B), we found a positive correlation between STAT1 and IRF1 levels in naïve-, pre-switched- and double negative B cells (Fig. 2A, Suppl. Fig. S4B) as well as in CD4⁺, CD4⁺ CD8⁺ T cells and DN T cells from pSS patients (Fig. 2B, Suppl. Fig. S4E). Noteworthy, none of these correlations were found in HD T and B cell subsets. Moreover, there was a correlation between IRF1 and IRP9 in pSS

patients' naïve-, pre-switched-, memory- and double negative B cells (Fig. 2A, Suppl. Fig. S4C) as well as in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 2B, Suppl. Fig. S4F).

In summary, our results show that baseline protein levels of STAT1, STAT2, IRP9 and IRF1 are co-regulated in T and B cell subsets from pSS patients, suggesting an upregulated IFN type I and II signaling in peripheral lymphocytes that is not found in HD.

3.5. STAT1 and IRP9 levels correlate with Siglec-1 a type I IFN signature biomarker

To further explore the association of STAT1 and IRP9 levels in T and B cells of patients with IFN signature, we simultaneously assessed Siglec-1 (CD169) expression on CD14⁺ monocytes, a validated surrogate biomarker of type I IFN signature [14]. We found positive correlations between Siglec-1 expression levels on CD14⁺ monocytes with STAT1 and IRP9 levels in all investigated T and B cell subsets in the pSS cohort only (Fig. 2C and D). Furthermore, the phosphorylation status of pSTAT1 (Y701) correlated with Siglec-1 expression in naïve-, pre-switched- and memory B cells, as well as in CD8⁺ T cells (Suppl. Fig. S5B). We also found a correlation between Siglec-1 expression on CD14⁺ monocytes and IRP9 levels in most T- and B cell subsets (Suppl. Fig. S5B). None of these correlations were found in HD.

These findings emphasize that pSS patients exhibit a globally activated IFN signature on various immune cells which is detectable in the periphery and subsequently lead to enhanced transcriptional activity with increased levels of IFN associated molecules.

3.6. STAT1 and IRP9 levels in B lineage cells correlate with autoantibody production in seropositive pSS patients

Next, we evaluated potential association of levels of IFN signaling molecules with laboratory characteristics in pSS patients by correlating the protein levels of STAT1, STAT2 and IRP9 in T and B cells with total IgG levels, ANA titers, presence or absence of autoantibodies against SSA and SSB and titers of rheumatoid factors (IgA and IgM) (Fig. 3A; Suppl. Fig. S5A).

Remarkably, we found strong correlations between serological findings and expression levels of STAT1 in all B cell subsets and most T cell subsets except CD8⁺ T cells (Fig. 3A; Suppl. Fig. S5A). In detail, serum hypergammaglobulinemia correlated with STAT1 levels in all T and B lineage cells with the exception of CD8⁺ T cells (Fig. 3B, Suppl. Fig. S5B). In addition, an increased level of STAT1 in T and B cells was associated with ANA titers in pSS (Fig. 3C; Suppl. Fig. S5C).

Highest levels of STAT1 in all B cell subsets were observed in patients positive for anti-SSA and anti-SSB autoantibodies (Fig. 3D). Notably, the levels of STAT1 protein could distinguish between pSS patients that were positive for anti-SSA and anti-SSB autoantibodies (double positive) and patients only positive for anti-SSA autoantibodies compared to HD (Fig. 3D). Importantly, STAT1 levels in plasmablasts segregated seronegative and double positive pSS patients (Fig. 3D). Double positive pSS patients showed also higher STAT1 levels in certain T cell subsets (Suppl. Fig. S5D). In contrast, only double positive pSS patients showed increased IRP9 levels compared to HD in most B cells and CD4⁺ and DN T cells (Suppl. Figs. S6E and S6F). Another positive correlation was found between IRP9 and ANA titers in naïve- and pre-switched memory B cells and in CD8⁺ and DN T cells (Fig. 3A; Suppl. Figs. S5A, S6C, S6D).

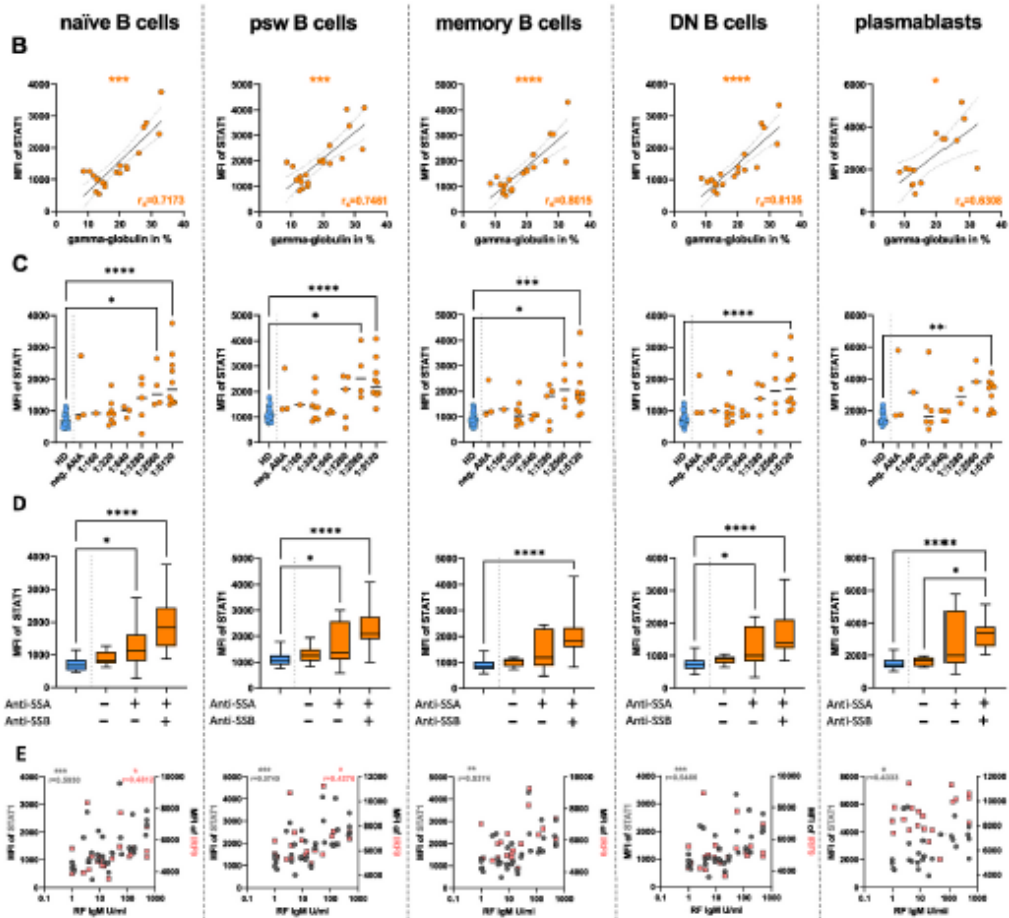
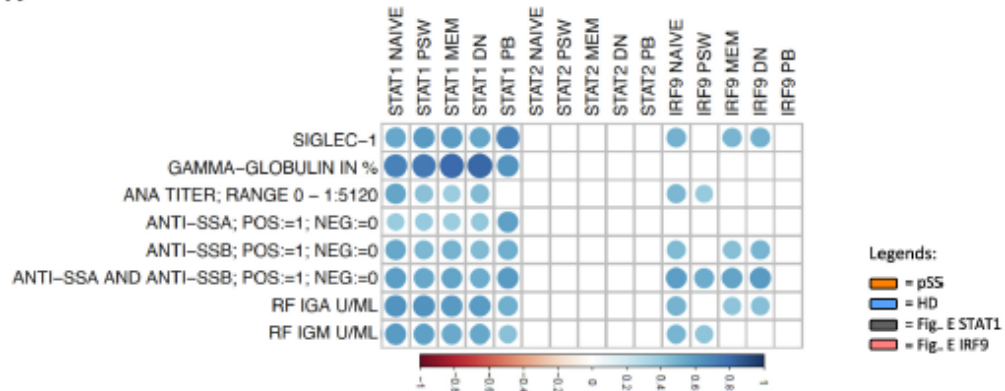
Regarding rheumatoid factors, titers of rheumatoid factor IgM and IgA correlated with STAT1 levels in all B cell subsets (Fig. 3E, Suppl. Figs. S7A and S7B) and in all T cell subsets beside CD8⁺ T cells (Suppl. Fig. S7E). Titers of rheumatoid factor (IgM) showed a correlation with IRP9 levels in naïve and pre-switched memory B cells (Fig. 3E), as well as, in CD8⁺ and DN T cells (Suppl. Fig. S7E).

In summary, high levels of STAT1 in T and B cell subsets are characteristic of patients with hypergammaglobulinemia, increased ANA titers and positive anti-SSA autoantibodies. STAT1 levels correlated with

J. Ritzer et al.

Journal of Autoimmunity 147 (2024) 105243

A



(caption on next page)

Fig. 3. STAT1 and IRP9 levels in B lineage cells correlate with autoantibody production in autoantibody positive pSS patients. (A) Correlation matrix depicting (positive correlation = blue, inverse correlations = red) of serological characteristics (gamma-globulin in %, antinuclear antibody titers (ANA), anti-SSA and anti-SSB antibodies and rheumatoid factors (RF) IgM/IgA) with STAT1, STAT2 and IRP9 expressed by B cell subsets of the studied patients. Size and intensity of color refer to the strength of correlation. (B) MFI of STAT1 correlates with gamma-globulin (%) in patients B cells. (C) MFI of STAT1 expressed by B cells in patients with antinuclear antibody (ANA) titers. ANA titers of HD were not determined but STAT1 levels are shown as reference. (D) MFI of STAT1 in B cells according to their serological profile (negative for anti-SSA or -SSB, anti-SSA single positive or anti-SSA/anti-SSB double positive). MWU test was performed with the double negative group and HDs as reference. (E) Scatterplot of MFI of STAT1 (grey, left axis) and IRP9 (pink, right axis) in B cell subsets of patients and references levels of IgM rheumatoid factor. Scatter plots represent means \pm SD; statistical significance was determined using two-tailed MWU (Mann Whitney U test). Statistical significance is depicted as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

typical pSS autoantibodies. These findings suggest a link between IFN activity and continuous activation of the characteristic humoral autoimmunity.

3.7. Increased levels of STAT1 in B lineage cells mark patients with extraglandular manifestations

Although anti-SSA autoantibodies and hypergammaglobulinemia are common in pSS patients, pSS is a heterogeneous chronic inflammatory autoimmune disease characterized by a wide spectrum of clinical manifestations. Novel biomarkers are needed to identify molecular characteristics of subgroups which can improve the performance of clinical studies.

Our pSS cohort included 34 patients, 13 with limited glandular (GL) and 21 with systemic organ manifestations (i.e. arthritis; BGL) (Table 1; Suppl. Table 1; Fig. 4A). BGL patients presented with an increased ESSDAI level (BGL 7.23 vs. GL 3.0; $p < 0.001$) (Fig. 4B) consistent with elevated clinical disease activity.

In a first step we investigated if STAT molecules can distinguish between different clinical pSS subgroups. In this regard MFI levels of STAT1 in all B cell subsets could distinguish between GL and BGL pSS patients (Fig. 4C and D). Interestingly, we did not detect any difference between levels of STAT2 and only IRP9 in DN B cells and plasmablasts distinguish between GL and BGL patients (Suppl. Figs. S8A and S8B). There were no differences in the levels of STAT1, STAT2 and IRP9 in T cells (Suppl. Figs. S8C–S8E), with the exception for IRP9 in DN T cells.

To further validate STAT1 as a biomarker for subgroup segregation, we evaluated the area under the curve (AUC) and ROC curve to test whether STAT1 could discriminate the pSS subgroups from HDs (Fig. 4D–F). STAT1 levels by plasmablasts could distinguish between HD versus GL and BGL pSS patients. The AUC for HD and GL pSS patients was 0.73. The defined cut-off for STAT1 was >1695 , which gives 75 % sensitivity and 76 % specificity (Fig. 4E). For HD and BGL pSS patients the cut-off value for STAT1 of the MFI was >2031 corresponding to 87 % sensitivity and 92 % specificity (Fig. 4F). Furthermore, a cut off for STAT1 MFI of >2053 could distinguish between GL and BGL pSS patients with a sensitivity of 87 % and a specificity of 83 % (Fig. 4D). The AUC for GL and BGL pSS patients was 0.84.

3.8. IRP9 levels correlate with ESSDAI

Since monitoring disease activity in pSS remains challenging and so far no biomarker has been established, we evaluated correlations between STAT/IRP molecules and ESSDAI. In this regard, we found that IRP9 levels in naïve-, memory-, DN B cells and T cell subsets correlated with ESSDAI (Fig. 4G and H). Surprisingly, STAT1 levels in T and B cells did not correlate with ESSDAI scores, and STAT2 levels inversely correlated with the ESSDAI (Fig. 4G and H).

In summary, the study provides evidence that STAT1 levels distinguished between patients suffering from glandular and extraglandular disease, while IRP9 levels correlated with the ESSDAI.

4. Discussion

Autoactive B lineage cells producing autoantibodies (e.g.

hypergammaglobulinemia, anti-SSA, anti-SSB) and the IFN signature are immune characteristics of pSS, but the relationship between both at a functional level remains poorly understood. In our study, we evaluated the levels and signaling molecules involved in the IFN signaling in peripheral T and B lineage cell subsets of patients with pSS. Here we found elevated baseline molecule levels of STAT1, STAT2 and IRP9 but no clear phosphorylation difference of pSTAT1 Y701 and pSTAT2 Y690 among peripheral T and B cell subsets. Thus, we conclude that a long-term IFN exposure continuously support the chronic inflammation via high levels of IFN signaling molecules without a distinct phosphorylation activity. Humoral autoimmunity was linked to the prominent IFN signature and we identified correlations for STAT1 and IRP9 proteins in T and B cell subsets with hypergammaglobulinemia, ANA titers and RF. We found that patients with positive anti-SSA and anti-SSB autoantibodies presented with highest levels of STAT1 in all B cell subsets. STAT1 molecule levels were also distinctly increased in the subgroup of BGL pSS and candidates as potential biomarker to segregate HDs from GL and BGL pSS patients, respectively. The overall data indicate that increased clinical activity converge into molecular signatures of increased IFN activity in T and B cell subsets of pSS patients and allows patient stratification for specific anti-IFN-targeted therapies.

Several studies have recognized the dominant role of IFN in the pathogenesis of pSS [9,32,33]. Transcriptomic studies identified high expression of IFN signature genes in total CD19⁺ B cells and salivary tissue [11,32–34], but little is known about the levels of IFN pathway proteins and particularly in peripheral T and B cell subsets. Here, we report for the first time elevated STAT1, STAT2 and IRP9 protein levels in peripheral T and B cell subsets in pSS patients. Interestingly, we did not find a clear difference regarding phosphorylation sites pSTAT1 and pSTAT2 in T and B cells in comparison to controls. However, an increased phosphorylated STAT1 after short term IFN stimulation demonstrated that pathway activation is conserve. Future experiments will have to dissect, if the increase in phosphorylated STAT1 is caused by an increased baseline amount of STAT1. Nevertheless, Cheon et al. showed that the increased amount of STAT1 was not additionally phosphorylated in response to IFN stimulation and acted independently [20]. Therefore, our results point towards a proper pathway activation while unphosphorylated STAT1 reflects a chronic signature of elevated prior cytokine exposure.

Early IFN response is characterized by increased phosphorylation status and has been observed in pSS PBMCs after direct IFN stimulation [15,35]. On the other hand, studies showed that phosphorylation of STAT molecules is not necessary for transcriptional activity [16,19,36,37]. Chronic exposure to IFN was reported to induce unphosphorylated (U) STAT1, U-STAT2 and IRP9 to form U-ISGF3 and act as U-transcription factor in late response to IFN exposure [19,38]. A recent SLE study suggested that noncanonical IFN signaling (without phosphorylation) directly entertain chronic hyperinflammation [39]. In our study, only naïve B cells and some T cell subsets of patients exhibited elevated phosphorylation of STAT1 (pSTAT1 701) at baseline. Otherwise, we found increased baseline STAT1, STAT2 and IRP9 protein levels compared to HD likely related to persistent IFN exposure in chronic disease. In this context, we recently described a transcriptional increase of STAT1 molecules in T and B cells in HD after 48 h long-term IFN stimulation [29]. In the same study, COVID 19 patients showed high

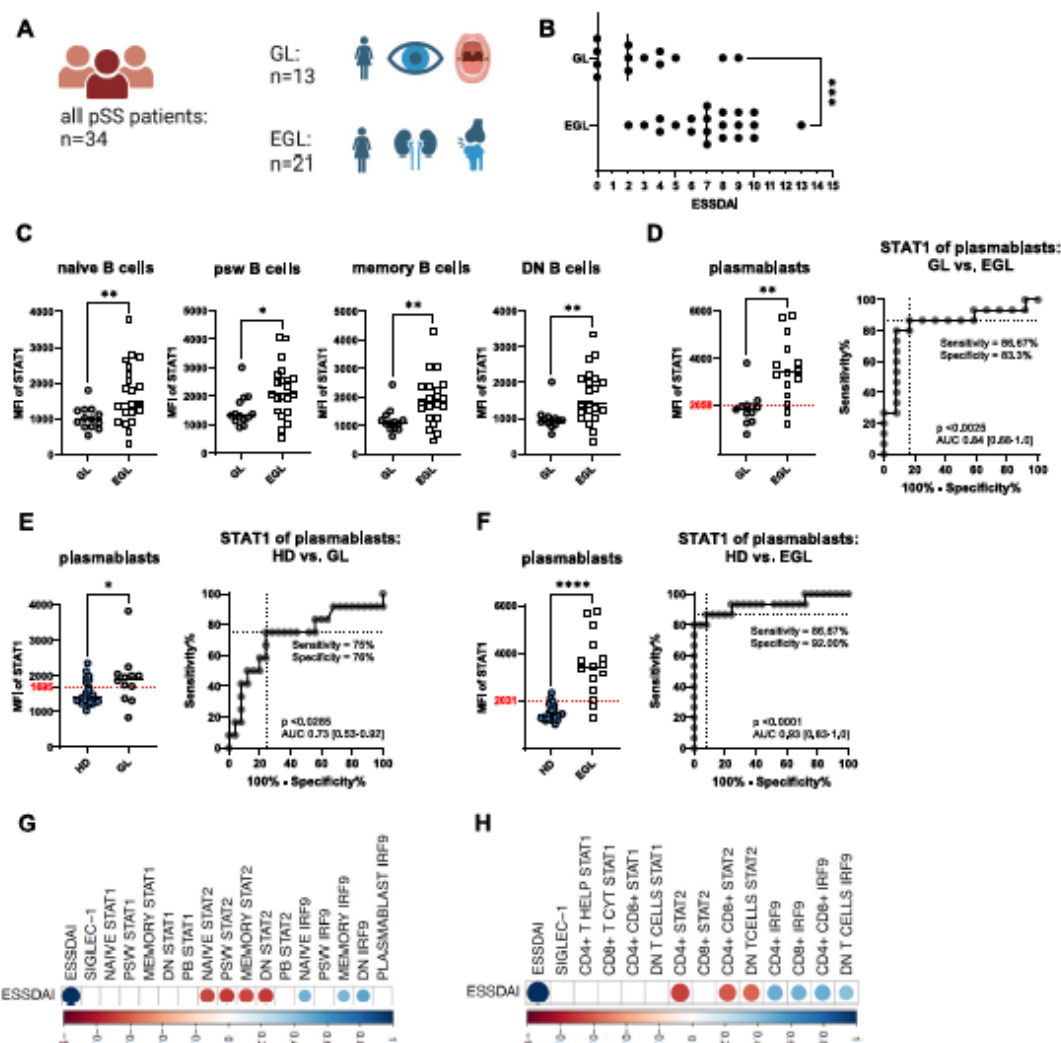


Fig. 4. High levels of STAT1 in B lineage cells identifies extraglandular pSS patients. (A) distribution of 34 pSS patients according to glandular (GL) and extraglandular (EGL) disease. (B) ESSDAI of GL versus EGL patients. (C) STAT1 levels in GL versus EGL pSS patients in B cell subsets. (D) Receiver Operating Characteristic curve (ROC curve) analysis and cut-offs of STAT1 levels by plasmablasts from GL versus EGL pSS patients to predict extraglandular disease, (E) HD versus GL and (F) HD versus EGL pSS patients. (G) Correlation matrix depicting STAT1, STAT2 and IRF9 levels by B cell subsets and (H) by T cell subsets of pSS patients and disease activity index (ESSDAI). ROC curve: ROC curve and area under the ROC curve (AUC) for STAT1 in plasmablasts, i.e. HD vs. GL: STAT1 can differentiate between HD and GL patients. Area under the curve (AUC), (95 % confidence interval; CI). Graph (A) created with Biorender. Scatter plots represent means \pm SD; statistical significance was determined using two-tailed MWU (Mann Whitney U test) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Correlation matrix depicting Spearman rho (positive correlation = blue, inverse correlations = red), Size and intensity of color refer to the strength of correlation.

levels of STAT1 and no clear changes in pSTAT1, indicating a permanent IFN exposure during viral immune response which shows similar patterns to chronic IFN-driven disease like pSS [29]. Our results are consistent with chronic IFN imprinting across T and B cell subsets in pSS patients.

Interestingly, a mouse study using knockout mice showed that

STAT1 and IRF9 as downstream molecules of type I IFN receptors are necessary for the generation of IgG autoantibodies [40]. Our findings of STAT1 and IRF9 molecules in cell subsets correlating with autoantibody production, suggest that IFN signals may be important for B cell activation and autoantibody formation in pSS.

The classical activation of B cells and generation of antibody

producing plasmablasts relies on germinal center-dependent T/B cell interaction [3,41,42]. In particular germinal center T follicular helper (T_{fh}) cells play a key role in this process [8]. T_{fh}-like cells are described to be elevated in the peripheral blood of pSS [43] and promote the maturation of B cells [7]. In this context, our results indicate that IFN is affecting T cell activation across different T cell subsets. Recently, a TOX molecule was described to differentiate CD4⁺ T cells to T_{fh} cells via IFN alpha signaling [44]. Our results are in line with these findings, as we found baseline IFN signaling proteins elevated in CD4⁺ T cells. The persistent activation of CD4⁺ T cells by IFN and subsequent T_{fh} cell induction in pSS may promote a constant B cell induction in the context of a (extra-) follicular reaction. Future studies may focus on the impact of IFN on regulatory T and B cells to investigate their potentially abnormal suppressive function and role in tolerance breach. In this context, a lupus mice study described dendritic cells and type I IFN as drivers of a T cell dependent extrafollicular plasmablasts production of autoantibodies [45]. The current results of IFN signaling molecules elevated in T and B cells correlating with autoantibodies in pSS highly support this mechanism in pSS patients. Finally, the clinical value of CD40 blockade [46] as well as anti-CD20 [47] or anti-BAPF-R [48] are consistent with a T/B maintenance loop entertaining chronic autoimmunity in pSS.

Recently, the first results from a phase II clinical trial for the use of filgotinib (JAK1-inhibitor), lanraplenib (Syk inhibitor) and tirabrutinib (BTK inhibitor) in primary and secondary Sjögren's syndrome patients were published [49]. The first and second endpoints were not met, but there was a decrease in IFN signature score, evaluated based on RNA expression of IFN related genes [49] with a strongest response to the JAK inhibitor. There is hope, that JAK/STAT inhibition can interrupt the IFN signaling cascade and block the activity of IFN signaling. In the light of the current findings, blocking Jak/STAT inhibiting acute phosphorylation of the pathway may subsequently also block the positive feedback loop of U-STAT1 as signature of chronic IFN exposure. In line with our current data, patients carrying elevated IFN signatures as biomarker may serve to enrich responders for such clinical trials but may also serve to monitor disease activity. Preliminary studies in four RA patients treated with approved JAK inhibitors showed simultaneous decrease of STAT1 levels in plasmablasts (data not shown). Thus, STAT1 as a biomarker can be measured to evaluate IFN inhibition in different cell lines and autoimmune diseases. Since certain clinical trials failed in pSS [50] and novel anti-IFN pharmacological drugs are in development, predefinition of responder subgroups is of great clinical relevance. In this context, we showed that levels of STAT1 could distinguish patients in glandular and extraglandular pSS patients based on their clinical profiles. STAT1 levels can be used as a monitor and stratification marker to include particular patients for further anti-IFN trials. Our study also found IRP9 as reliable marker to capture pSS disease activity possibly indicating that type I and type II IFN together define immune activity. While IRP9 as biomarker requires further validation, how and to which individual extent type I and II IFN contribute, requires further studies.

This study has certain limitations. Firstly, pSS is a heterogeneous disease and the patients in our pSS cohort were at rather low to moderate clinical activity: no patient enrolled was suffering from severe organ manifestations. Secondly, the limited sample size, especially for the different subgroups, reduced the statistical power. Thirdly, some of our pSS patients received treatment and we cannot fully exclude that this may have influenced our study.

To conclude, we found elevated STAT1, STAT2 and IRP9 protein levels in different T and B cell subsets in pSS. There was no clear difference in the baseline phosphorylation of pSTAT1 and pSTAT2 but a reduced phospho/protein ratio of STAT1 in pSS with simultaneously increased basic protein levels. We conclude that increased levels of IFN signaling molecules in pSS represent imprints of long-term IFN exposure related to signatures of inflammation. This continuous immune activation of T and B cell subsets is associated with typical serological abnormalities. Higher levels of STAT1 marked pSS patients suffering from

extraglandular manifestations and could distinguish between the subgroups.

Collectively, the data highlight the role of IFN signaling by T and B cells among pSS patients. High levels of STAT1 and IRP9 could serve as biomarkers and provide a rationale for targeting JAK/STAT signaling in this entity.

Author contributions

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important content, all authors approved the final version to be published. JR, FS, TD had full access to all the data of the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Ritter, Szelinski, Dörner.

Acquisition of data. Ritter, Szelinski, Aue, Stefanski, Rincon-Arevalo, Chen, Nitschke, Dang, Wiedemann, Schrezenmeier, Lino, Dörner.

Analysis and interpretation of data. Ritter, Szelinski, Dörner.

Funding sources

JR received a medical student research stipend from the Berlin Institute of Health. ES was supported with a fellowship from the Berlin Institute of Health.

TD: part of the study was supported by a grant of the EU H2020 initiative HarmonicSS and DPO grants Do491/7-5; 11-1, 12-1, 13-1 "Because Y" CRC project to TD.

The Deutsches Rheumaforschungszentrum was supported by the Senate of Berlin. ALS work was supported by DGRh Research Initiative 2020 and Rahel Hirsch grant. HRA work was supported by COLCIEN-CIAS (scholarship 727, 2015).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank Karin Reiter from our lab for her technical support and Berivan Sevimli from the outpatient unit for her constant collaboration and support with the blood and patient recruitment.

In addition, we would like to explicitly thank all patients in this study for their participation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2024.103243>.

References

- [1] X. Mariette, L.A. Criswell, Primary Sjögren's syndrome, *N. Engl. J. Med.* (2018); 379:96-97.
- [2] J. Ritter, Y. Chen, A.L. Stefanski, T. Dörner, Current and future treatment in primary Sjögren's syndrome - a still challenging development, *Joint Bone Spine* 89 (6) (2022) 105-106.
- [3] M.G.A. Broeren, J.J. Wang, G. Balzaretti, P. Groenen, B.D.C. van Schaik, T. Chataway, et al., Proteogenomic analysis of the autoreactive B cell repertoire in blood and tissues of patients with Sjögren's syndrome, *Ann. Rheum. Dis.* (2022); 81 (5):644-652.
- [4] Moya M. Sáez, B. Gutiérrez-Cózar, J. Puñet-Ortiz, M.L. Rodríguez de la Conde, J. Blanco, J. Carrillo, P. Engel, Autoimmune B cell repertoire in a mouse model of Sjögren's syndrome, *Front. Immunol.* 12 (2021) 6665-65.

- [5] Y. Yao, J.F. Ma, C. Chang, T. Xu, C.Y. Gao, M.E. Gershwin, Z.X. Lian, Immunobiology of T Cells in Sjögren's syndrome, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 60 (1) (2021) 111–131.
- [6] E. Riviere, J. Pascand, A. Viron, A. Dupré, B. Ly, A. Paoletti, et al., Interleukin-7/ Interferon Axis drives T cell and salivary gland epithelial cell interactions in Sjögren's syndrome, *Arthritis Rheumatol.* 73 (4) (2021) 631–640.
- [7] L. Jin, D. Yu, X. Li, N. Yu, X. Li, Y. Wang, Y. Wang, CD4+CXCR5+ follicular helper T cells in salivary gland promote B cells maturation in patients with primary Sjögren's syndrome, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (5) (2014) 1988–1996.
- [8] Z. Shulman, A.D. Giffis, S. Tang, M. Jaskovic, G. Pasqual, M.C. Nussenzeig, G. D. Victors, T follicular helper cell dynamics in germinal centers, *Science* 341 (6146) (2013) 673–677.
- [9] Z. Bekic, N.I. Maria, G.V. Helden-Meunissen, Merwe Jyod, Dazle Piv, V.A. Dalin, et al., Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjögren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression, *Ann. Rheum. Dis.* 72 (5) (2013) 728–735.
- [10] T.O. Hjeltnervik, K. Petersen, I. Jonassen, R. Jonsson, A.I. Bolstad, Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects, *Arthritis Rheum.* 52 (5) (2005) 1534–1544.
- [11] G.M. Verstappen, L. Gao, S. Pringle, E.A. Haacke, B. van der Vegt, S.C. Liefers, et al., The transcriptome of paired major and minor salivary gland tissue in patients with primary Sjögren's syndrome, *Front. Immunol.* 12 (2021) 681941.
- [12] X. Chen, S. Jiang, Z. Zhou, X. Xu, S. Yang, L. Du, et al., Increased expression of interleukin-21-inducible genes in minor salivary glands are associated with primary Sjögren's syndrome disease characteristics, *Rheumatology* (2020); 60 (6): 2979–2989.
- [13] R. Biesen, C. Demir, F. Barkhadarova, J.R. Grün, M. Steinhilber-Zöllner, M. Bachhaus, et al., Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 58 (4) (2008) 1136–1145.
- [14] T. Rose, F. Szellinski, A. Listey, K. Reiter, S.J. Fleischer, G.R. Burmester, et al., SIGLEC1 is a biomarker of disease activity and indicates extraglandular manifestation in primary Sjögren's syndrome, *RMD Open* 2 (2) (2016).
- [15] L.C. Platanias, Mechanisms of type-I and type-II-Interferon-mediated signalling, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (5) (2005) 375–386.
- [16] A. Majoros, E. Platanias, E. Kemnauer-Hüdel, F. Rosebrock, M. Miller, T. Decker, Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signalling: lessons from interferons for cytokine responses, *Front. Immunol.* 8 (2017) 29.
- [17] A. Michaliska, K. Blaszczyk, J. Wesoly, H.A.R. Blaysses, A positive feedback amplifier circuit that regulates interferon (IFN)-stimulated gene expression and controls type I and type II IFN responses, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1135.
- [18] A. Forero, S. Ozarkar, H. Li, C.H. Lee, E.A. Hemans, M.S. Nadjsomhaji, et al., Differential activation of the transcription factor IRF1 underlies the distinct immune responses elicited by type I and type III interferons, *Immunity* 51 (3) (2019) 451–464.e8.
- [19] H. Chon, G.R. Stark, Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (23) (2009) 9373–9378.
- [20] H. Chon, E.G. Holvey-Bates, J.W. Schoggins, S. Forster, P. Hertzog, N. Imanaka, et al., IFN β -dependent increases in STAT1, STAT2, and IRP9 mediate resistance to viruses and DNA damage, *EMBO J.* 32 (20) (2013) 2751–2763.
- [21] H. Chon, E.C. Boeden, G.R. Stark, Interferons and their stimulated genes in the tumor microenvironment, *Semin. Oncol.* 41 (2) (2014) 156–173.
- [22] J. Yang, G.R. Stark, Roles of unphosphorylated STATs in signalling, *Cell Res.* 18 (4) (2008) 443–451.
- [23] X. Mariette, R. Seror, L. Quartuccio, G. Baron, S. Salvin, M. Fabris, et al., Efficacy and safety of belimumab in primary Sjögren's syndrome: results of the BELISS open-label phase II study, *Ann. Rheum. Dis.* 74 (3) (2015) 526–531.
- [24] P.M. Meiners, A. Vissink, F.G. Kroese, F.X. Spijkervet, N.S. Smitt-Kammings, W. H. Abdulhadi, et al., Abatacept treatment reduces disease activity in early primary Sjögren's syndrome (open-label proof of concept ASAP study), *Ann. Rheum. Dis.* 73 (7) (2014) 1393–1396.
- [25] G. Sciences, G. Nv, O.P.C. Ltd, Study to assess safety and efficacy of filgotinib, lanraplenib and tirabrutinib in adults with active Sjögren's syndrome. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT03100942>, 2017.
- [26] C.H. Shihooki, S.C. Shihooki, R. Seror, L.A. Criswell, M. Labetoulle, T.M. Lietman, et al., 2016 American College of Rheumatology/European League against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts, *Ann. Rheum. Dis.* 76 (1) (2017) 9–16.
- [27] R. Seror, P. Raynard, S.J. Bowman, G. Baron, A. Tricoufas, E. Theander, et al., EULAR Sjögren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjögren's syndrome, *Ann. Rheum. Dis.* 69 (6) (2010) 1103–1109.
- [28] A. Aue, F. Szellinski, S.Y. Weibenberg, A. Wiedemann, T. Rose, A.C. Liao, T. Dörner, Elevated STAT1 expression but not phosphorylation in lupus B cells correlates with disease activity and increased plasmablast susceptibility, *Rheumatology* 59 (11) (2020) 3435–3442.
- [29] H. Rincon-Arevalo, A. Aue, J. Ritter, F. Szellinski, D. Khadzhynov, D. Zickler, et al., Altered increase in STAT1 expression and phosphorylation in severe COVID-19, *Eur. J. Immunol.* 52 (1) (2022) 138–148.
- [30] D. Trutschel, P. Bost, X. Mariette, V. Boudet, A. Llibre, C. Poesseme, et al., Variability of primary Sjögren's syndrome is driven by interferon- α and interferon- β blood levels are associated with the class II HLA-DQ locus, *Arthritis Rheumatol.* 74 (12) (2022) 1991–2002.
- [31] Y. Yao, Z. Liu, B. Jialal, N. Shen, L. Rönblom, Type I interferons in Sjögren's syndrome, *Autoimmun. Rev.* 12 (5) (2013) 558–566.
- [32] J. Ingemberg-Kreuz, J.K. Sandling, A. Björk, J. Nordlund, M. Kvarnström, M. L. Eloanta, et al., Transcription profiling of peripheral B cells in antibody-positive primary Sjögren's syndrome reveals upregulated expression of CXCR1 and a type I and type II interferon signature, *Scand. J. Immunol.* 87 (5) (2018) e12662.
- [33] J.C. Hall, A.N. Baer, A.A. Shah, L.A. Criswell, C.H. Shihooki, A. Rosen, L. Casciola-Rosen, Molecular subsetting of interferon pathways in Sjögren's syndrome, *Arthritis Rheumatol.* 67 (9) (2015) 2437–2446.
- [34] R. Davies, D. Hammenfors, B. Bergum, P. Vogelsang, S. Gavasso, J.G. Brun, et al., Aberrant cell signalling in PBMCs upon IFN- α stimulation in primary Sjögren's syndrome patients associates with type I interferon signature, *Eur. J. Immunol.* 48 (7) (2018) 1217–1227.
- [35] I. Sarkar, R. Davies, A.K. Aarebrot, S.M. Sollberg, A. Petrovic, A.M. Joshi, et al., Aberrant signaling of immune cells in Sjögren's syndrome patient subgroups upon interferon stimulation, *Front. Immunol.* 13 (2022) 854183.
- [36] M. Chatterjee-Kishore, K.L. Wright, J.P. Ting, G.R. Stark, How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene, *EMBO J.* 19 (15) (2000) 4111–4122.
- [37] T. Meyer, K. Gavens, U. Vinkemeier, Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3, *Exp. Cell Res.* 222 (1) (2002) 45–55.
- [38] K. Yao, Q. Chen, Y. Wu, F. Liu, X. Chen, Y. Zhang, Unphosphorylated STAT1 represses apoptosis in macrophages during Mycobacterium tuberculosis infection, *J. Cell Sci.* 130 (10) (2017) 1740–1751.
- [39] H.W. Jeong, J.S. Lee, J.H. Ko, S. Hong, S.T. Oh, S. Choi, et al., Corticosteroids reduce pathologic interferon responses by downregulating STAT1 in patients with high-risk COVID-19, *Exp. Mol. Med.* (2023) 1–12.
- [40] D.L. Thibault, A.D. Chu, K.L. Graham, I. Balboni, L.Y. Lee, C. Koldmooos, et al., IRP9 and STAT1 are required for IgG autoantibody production and B cell expression of TLR7 in mice, *J. Clin. Invest.* 118 (4) (2008) 1417–1426.
- [41] G.D. Victors, M.C. Nussenzeig, Germinal centers, *Annu. Rev. Immunol.* 40 (2022) 413–442.
- [42] S.T. Chen, T.Y. Oliveira, A. Gazaryan, M. Cipolla, M.C. Nussenzeig, B cell receptor signaling in germinal centers prolongs survival and primes B cells for selection, *Immunity* 56 (3) (2023) 547, 61.e7.
- [43] K. Szabó, G. Papp, A. Sziszó, T. Tarr, M. Zeher, A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.* 183 (1) (2016) 76–89.
- [44] S. Liu, Y. Yang, L. Zeng, L. Wang, C. He, Z. Chen, et al., TOX promotes follicular helper T cell differentiation in patients with primary Sjögren's syndrome, *Rheumatology* (2022); 62(2):946–957.
- [45] C. Soni, O.A. Perez, W.N. Voss, J.N. Pucella, L. Serpas, J. Mehl, et al., Plasmacytoid dendritic cells and type I interferon promote extrafollicular B cell responses to extracellular self-DNA, *Immunity* 52 (6) (2020) 1022, 38.e7.
- [46] B.A. Fidler, A. Szász, W.-F. Ng, M. Bombardieri, M.G. Posch, A.S. Papas, et al., Assessment of the anti-CD40 antibody icatimab in patients with primary Sjögren's syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study, *The Lancet Rheumatology* 2 (3) (2020) e142, e52.
- [47] V. Devauchelle-Pensec, X. Mariette, S. Jousse-Joulin, J.M. Berthelot, A. Perdriger, X. Puchel, et al., Treatment of primary Sjögren syndrome with rituximab: a randomized trial, *Ann. Intern. Med.* 160 (4) (2014) 233–242.
- [48] S.J. Bowman, R. Fox, T. Dörner, X. Mariette, A. Papas, T. Grader-Beck, et al., Safety and efficacy of subcutaneous lanatumab (VAY736) in patients with primary Sjögren's syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b dose-finding trial, *Lancet* 399 (10320) (2022) 161–171.
- [49] E. Price, M. Bombardieri, A. Kivitz, F. Matzkies, O. Gurtovaya, A. Pechonkina, et al., Safety and efficacy of filgotinib, lanraplenib and tirabrutinib in Sjögren's syndrome: a randomised, phase 2, double-blind, placebo-controlled study, *Rheumatology* 61 (12) (2022) 4797–4808.
- [50] R.I. Fox, C.M. Fox, Sjögren syndrome: why do clinical trials fail? *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 42 (3) (2016) 519–530.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Differential response of IgM and IgG memory B cell populations to CD40L: insights of T cell - memory B cell interactions.

Rincon-Arevalo H, Stefanski AL, Anh Le T, Cases M, Wiedemann A, Szelinski F, **Ritter J**, Dang VD, Lino AC, Dörner T, Schrezenmeier E.

Front Immunol. 2024 Jul 10:15:1432045. doi: 10.3389/fimmu.2024.1432045. **IF 5,7**

Dysregulation of immune checkpoint molecules as a characteristic of autoimmune congenital heart block.

Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Dressler-Steinbach I, Nomovi N, Mackert A, Aue A, **Ritter J**, Wiedemann A, Szelinski F, Schrezenmeier E, Kühl AA, Lino AC, Henrich W, Dörner T.

Ann Rheum Dis. 2024 Jul 12:ard-2024-226176. doi: 10.1136/ard-2024-226176. **IF 20,3**

Elevated unphosphorylated STAT1 and IRF9 in T and B cells of primary sjögren's syndrome: Novel biomarkers for disease activity and subsets.

Ritter J, Szelinski F, Aue A, Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Chen Y, Nitschke E, Dang VD, Wiedemann A, Schrezenmeier E, Lino AC, Dörner T.

J Autoimmunity. 2024 May 23:147:103243. Doi: 10.1016/j.jaut.2024.103243. **IF 12,8**

Recruitment of plasma cells from IL-21-dependent and IL-21-independent immune reactions to the bone marrow.

Ferreira-Gomes M #, Chen Y #, Durek P #, Rincon-Arevalo H, Heinrich F, Bauer L, Szelinski F, Maria Guerra GM, Stefanski AL, Niedobitek A, Wiedemann A, Bondareva M, **Ritter J**, Lehmann K, Hardt S, Hipfl C, Hein S, Hildt E, Matz M, Mei HE, Cheng Q, Dang VD, Witkowski M, Lino AC, Kruglov A, Melchers F, Perka C, Schrezenmeier E, Hutloff A, Radbruch A #, Dörner T #, Mashreghi MF #.

Nat Commun. 2024 May 17; 15(1):4182. Doi: 10.1038/s41467-024-48570-0. **IF 16,6**

Plasmablast-like Phenotype Among Antigen-Experienced CXCR5-CD19^{low} B Cells in Systemic Lupus Erythematosus.

Szelinski F, Stefanski AL, Schrezenmeier E, Rincon-Arevalo H, Wiedemann A, Reiter K, **Ritter J**, Lettau M, Dang VD, Fuchs S, Frei AP, Alexander T, Lino AC, Dörner T. *Arthritis Rheumatol.* 2022 Sep;74(9):1556-1568. doi: 10.1002/art.42157. **IF 13,3**

Persistent but atypical germinal center reaction among 3rd SARS-CoV-2 vaccination after rituximab exposure.

Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Schrezenmeier E, Karberg K, Szelinski F, **Ritter J**, Chen Y, Meisel C, Jahrsdörfer B, Ludwig C, Schrezenmeier H, Lino AC, Dörner T. *Front Immunol.* 2022 Aug 10;13:943476. doi: 10.3389/fimmu.2022.943476. **IF 7,3**

B Cell Numbers Predict Humoral and Cellular Response Upon SARS-CoV-2 Vaccination Among Patients Treated With Rituximab.

Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Schrezenmeier E, Karberg K, Szelinski F, **Ritter J**, Jahrsdörfer B, Schrezenmeier H, Ludwig C, Sattler A, Kotsch K, Chen Y, Claußnitzer A, Haibel H, Proft F, Guerra G, Durek P, Heinrich F, Ferreira-Gomes M, Burmester GR, Radbruch A, Mashreghi MF, Lino AC, Dörner T. *Arthritis Rheumatol.* 2022 Jun;74(6):934-947. doi: 10.1002/art.42060. **IF 13,3**

CD39 and CD326 Are Bona Fide Markers of Murine and Human Plasma Cells and Identify a Bone Marrow Specific Plasma Cell Subpopulation in Lupus.

Dang VD, Mohr E, Szelinski F, Le TA, **Ritter J**, Hinnenthal T, Stefanski AL, Schrezenmeier E, Ocvirk S, Hipfl C, Hardt S, Cheng Q, Hiepe F, Löhning M, Dörner T, Lino AC. *Front Immunol.* 2022 Apr 8;13:873217. doi: 10.3389/fimmu.2022.873217. **IF 7,3**

B Cell Characteristics at Baseline Predict Vaccination Response in RTX Treated Patients.

Stefanski AL, Rincon-Arevalo H, Schrezenmeier E, Karberg K, Szelinski F, **Ritter J**, Chen Y, Jahrsdörfer B, Ludwig C, Schrezenmeier H, Lino AC, Dörner T. *Front Immunol.* 2022 Apr 19;13:822885. doi: 10.3389/fimmu.2022.822885. **IF 7,3**

Altered increase in STAT1 expression and phosphorylation in severe COVID-19.
Rincon-Arevalo H*, Aue A*, **Ritter J**, Szelinski F, Khadzhynov D, Zickler D, Stefanski L, Lino AC, Körper S, Eckardt KU, Schrezenmeier H, Dörner T, Schrezenmeier EV.
Eur J Immunol. 2022 Jan;52(1):138-148. doi: 10.1002/eji.202149575. **IF 6,7**

Übersichtsartikel

Towards the identification of novel autoantibodies in Sjögren's syndrome.
Witte T, Engelke F, **Ritter J**, Dörner T, De Vita S, Goules AV, Tzioufas AG.
Clin Exp Rheumatol. 2022 Dec;40(12):2395-2397. doi: 10.55563/clinexprheumatol/sba8k2. **IF 4,86**

Current and future treatment in primary Sjögren's syndrome - A still challenging development.

Ritter J, Chen Y, Stefanski AL, Dörner T.
Joint Bone Spine. 2022 Nov;89(6):105406. doi: 10.1016/j.jbspin.2022.105406. **IF 4,2**

Abstracts

POS0993 Elevated intracellular IFN signaling by T and B cells but unaltered B cell distribution is a characteristic of Anti-SSA positive asymptomatic women at-risk for congenital heart block

J. Ritter, F. Szelinski, A. Aue, A. L. Stefanski, E. Schrezenmeier, A. C. Lino, T. Dörner
Annals of Rheumatic Diseases 2024;83:863-864.

OP0213 Characteristic enrichment of antiphospholipid-reactive B cells among atypical memory subsets of primary APS suggest ongoing induction in extrafollicular sites.

E. Nitschke, V. D. Dang, H. Rincon-Arevalo, F. Szelinski, **J. Ritter**, E. Schrezenmeier, T. Alexander, T. A. Le, Y. Chen, A. Glenzer, J. B. Gonzales, A. Lino, A. L. Stefanski, T. Dörner

Annals of the Rheumatic Diseases 2023;**82**:140.

POS0050 B cell characteristics at baseline predict humoral response upon Sars-CoV-2 vaccination among patients treated with rituximab.

A. L. Stefanski, H. Rincon-Arevalo, E. Schrezenmeier, K. Karberg, F. Szelinski, **J. Ritter**, B. Jahresdoerfer, H. Schrezenmeier, C. Ludwig, Y. Chen, A. Claußnitzer, A. Lino, T. Dörner

Annals of the Rheumatic Diseases 2022;**81**:240-241.

POS0452 Abnormality of type I Interferon signalling in B cells in primary Sjögren´s syndrome and the impact on laboratory and clinical findings.

J. Ritter, F. Szelinski, A. Aue, A. L. Stefanski, E. Schrezenmeier, T. Dörner

Annals of the Rheumatic Diseases 2022;**81**:480.

Vorträge/Posterbeiträge

EULAR Kongress 2024; 12.06.-15.06.2024 in Wien, AT

Posterpräsentation: Elevated intracellular IFN signaling by T and B cells but unaltered B cell distribution is a characteristic of Anti-SSA positive asymptomatic women at-risk for congenital heart block

16th Sjögren´s disease Symposium 2024; 22.-25.04.2024 in Egmond an Zee, NL

Posterpräsentation: Elevated intracellular IFN signaling by T- and B cells is characteristic of Anti-SSA positive asymptomatic women at-risk for congenital heart block

15th Sjögren Syndrom Symposium 2022; 07.-10.09.2022 in Rom, IT

Posterpräsentation: Abnormality of Type I Interferon Signalling in B cells in primary Sjögren´s syndrome and the impact on laboratory and clinical findings

EULAR Kongress 2022; 04.-06.06.2022 in Kopenhagen, DK

Posterpräsentation: Abnormality of Type I Interferon Signalling in B cells in primary Sjögren´s syndrome and the impact on laboratory and clinical findings

DGRh Kongress 2022; 31.08.-03.09.2022 in Berlin, GER

Vortrag: Abnormalities of type I and type II Interferon signalling in B cells in primary Sjögren´s syndrome were associated to subgroups with elevated serological activity

Berlin-Oxford School 2022; Juni 2022 in Berlin, GER

Posterpräsentation: Abnormalities of type I and type II Interferon signalling in B cells in primary Sjögren´s syndrome were associated to subgroups with elevated serological activity

Autumn School of the german society for Immunology 2021; Merseburg; GER

Posterpräsentation: Abnormality of Type I Interferon Signalling in B cells in primary Sjögren´s syndrome and the impact on laboratory and clinical findings

Danksagung

Meine Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.