

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und  
Rheumatologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von mesenterialem Fettgewebe und Leptin in der  
Pathophysiologie des Morbus Crohn

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jörn Felix Ziegler

aus Esslingen a. N.

Datum der Promotion: 17.09.2021

## Vorbemerkung

Diese Dissertation fasst den Kontext, die verwendete Methodik, die wichtigsten Ergebnisse sowie die Schlussfolgerungen, mögliche klinische Anwendungen und die durch die Arbeit neu aufgeworfenen wissenschaftlichen Fragen zur Publikation „Leptin induces TNF $\alpha$ -dependent inflammation in acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn's disease“ von Ziegler *et al.* im Journal *Nature Communications* aus dem Jahre 2019 zusammen und vertieft in ausgewählten Bereichen die Einordnung der Publikation. Entsprechend sind Teile dieser Arbeit bereits in obiger Publikation veröffentlicht worden<sup>1</sup>.

Zur besseren Lesbarkeit wurde in dieser Dissertation das generische Maskulinum gewählt, es sind aber selbstverständlich und ausdrücklich auch stets die weibliche und jede andere Geschlechtsidentität gemeint, sofern sich dort nicht explizit auf eine bestimmte Form bezogen wird.

<sup>1</sup> Ziegler, J. F., Böttcher, C., Letizia, M., Yerinde, C., Wu, H., Freise, I., Rodriguez-Sillke, Y., Stoyanova, A. K., Kreis, M. E., Asbach, P., Kunkel, D., Priller, J., Anagnostopoulos, I., Kühl, A. A., Miehle, K., Stumvoll, M., Tran, F., Fredrich, B., Forster, M., Franke, A., Bojarski, C., Glauen, R., Löscher, B. S., Siegmund, B. & Weidinger, C. Leptin Induces TNF $\alpha$ -Dependent Inflammation in Acquired Generalized Lipodystrophy and Combined Crohn's Disease. *Nature Communications* 10, 5629, doi:10.1038/s41467-019-13559-7 (2019).

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abstract (Deutsch und Englisch) .....	6
1. Manteltext.....	8
1.1. Einleitung .....	8
1.2. Methodik .....	9
1.2.1. Probanden und Ethikvotum.....	9
1.2.2. Isolierung von Immunzellen aus peripherem Blut .....	10
1.2.3. Isolierung von Serumproben .....	10
1.2.4. Massenzytometrie .....	10
1.2.5. Durchflusszytometrie.....	13
1.2.6. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	14
1.2.7. Messung des Gehalts an intrazellulären Lipiden .....	14
1.2.8. Bestimmung der zellulären Glukose-Aufnahme.....	15
1.2.9. Messung des Calcium-Einstroms in Immunzellen .....	15
1.2.10. Bead-basierter durchflusszytometrischer Multiplex Immunoassay .....	16
1.2.11. Seahorse Analysen.....	16
1.2.12. Histopathologie .....	17
1.2.13. Scratch Assays .....	18
1.2.14. Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes .....	18
1.2.15. Statistik und graphische Darstellung .....	19
1.2.16. Exom-Sequenzierung .....	19
1.3. Ergebnisse .....	19
1.4. Diskussion.....	24
1.5. Literaturverzeichnis .....	28
2. Eidesstattliche Versicherung .....	32
3. Ausführliche Anteilserklärung .....	33
4. Auszug Journal Summary List.....	35
5. Publikation.....	36

6. Lebenslauf.....	47
7. Publikationsliste.....	48
8. Danksagungen .....	49

## Abkürzungsverzeichnis

ADRP	„Adipose differentiation-related protein“
AGLCD	Erworbene generalisierte Lipodystrophie mit kombiniertem Morbus Crohn (von Englisch „Acquired generalized lipodystrophy with combined Crohn’s disease“)
APC	Allophycocyanin
BODIPY	Boron-dipyrrromethen
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR	C-C-Chemokin Rezeptoren
CD[Zahl]	„Cluster of Differentiation“
Cy5.5 bzw. Cy7	Cyanin 5.5 bzw. 7
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran Natriumsulfat (von Englisch „dextran sulfate sodium“)
ECAR	Extrazelluläre Azidifizierungsrate
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“; ein Enzym-gekoppeltes, Antikörper-basiertes immunologisches Nachweisverfahren
EMR1	„Epidermal-growth-factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötales bovines Serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen – Isotyp DR
hpf	High-Power Felder; visuelles Feld bei 400-facher Vergrößerung
IL-[Zahl]	Interleukin [Zahl]
IL-7R	Interleukin-7-Rezeptor
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
LPS	Lipopolysaccharid
M. Crohn	Morbus Crohn

MACS®	„Magnetic Activated Cell Sorting“; ein von Miltenyi Biotec entwickeltes Säulen-basiertes Verfahren zur Selektion von Zellen mittels an Antikörper-gekoppelten magnetisierbaren Mikrosphären
MCP-1	Makrophagen chemotaktisches Protein 1
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MIG	Monokin induziert von Gamma-Interferon
MIP-1 $\beta$	Makrophagen inflammatorisches Protein 1 $\beta$
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OCR	„Oxygen Consumption Rate“; Englisch für Sauerstoffverbrauchsrate
PBMCs	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (von Englisch „Peripheral Blood Mononuclear Cells“)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (von Englisch „Phosphate Buffered Saline“)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rLeptin	Rekombinantes <i>N</i> -Methionylleptin; auch Metreleptin genannt
SOCE	„Store-operated Calcium Entry“
T-bet	„T-box expressed in T cells“
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
t-SNE	“t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” Algorithmus
viSNE	Visualisierte Darstellung der Ergebnisse des t-SNE Algorithmus

## Abstract (Deutsch)

Eine zunehmende Anzahl an Studien weist auf eine bedeutende Rolle von mesenterialem Fettgewebe in der Pathophysiologie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere beim Morbus Crohn, hin. Beim Morbus Crohn hypertrophiert das mesenteriale Fettgewebe im Bereich entzündeter Dünndarmabschnitte und umschließt diese als sogenanntes „Creeping Fat“. Die genaue Bedeutung des mesenterialen Fettgewebes für die intestinale Inflammation ist jedoch noch nicht genau geklärt. Allerdings können verstärkt sekretierte Adipokine wie Leptin oder Adiponektin im Tierversuch und *in vitro* immunmodulatorische Effekte ausüben. Für den Menschen gibt es allerdings keine Daten zur *in vivo* Wirkung dieser Adipokine im Rahmen von intestinaler Inflammation.

Im Rahmen dieser Arbeit beschreiben wir nun den nach unserem Wissen einzig bekannten Fall eines Patienten mit der Kombination aus einer erworbenen generalisierten Lipodystrophie und einem Morbus Crohn (AGLCD), wobei die generalisierte Lipodystrophie ein äußerst seltenes Krankheitsbild darstellt. Die generalisierte Lipodystrophie stellt eine der sehr wenigen Indikationen für eine Leptin-Substitution dar. Wir haben die Effekte der Therapie mit rekombinantem *N*-Methionylleptin (rLeptin) auf das Immunsystem und die intestinale Inflammation in diesem Patienten tiefgehend mittels Massen- und Durchflusszytometrie, funktionellen sowie metabolischen Analysen untersucht und dessen Immunphänotyp mit dem von gesunden Kontrollen und Morbus Crohn-Patienten verglichen.

In dem hier untersuchten Patienten mit AGLCD zeigten sich vor rLeptin-Therapie ein klinisch aktiver Morbus Crohn, ein absoluter Leptinmangel und im Vergleich mit den Kontrollgruppen eine vergleichbare bis leicht reduzierte Tumornekrosefaktor- $\alpha$ - (TNF $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$ -Produktion in mononukleären Zellen des peripheren Bluts sowie ein distinkter Immunphänotyp. Nach rLeptin-Substitution kam es zu einer Verschlechterung des Morbus Crohn sowie nach einer notwendigen Darmresektion zu zügig wieder aufflammender intestinaler Inflammation, wobei sich *ex vivo* eine gesteigerte TNF $\alpha$ -Produktion in T-Zellen und Monozyten, Änderungen des Immunphänotyps und experimentell Veränderungen im Immunzellmetabolismus nachweisen ließen. Nach Beginn einer anti-TNF $\alpha$ -Therapie mit Adalimumab stellte sich eine endoskopische und klinische Remission ein.

Zusammenfassend demonstriert diese Studie in Einklang mit früheren *in vitro* Daten und Ergebnissen aus Tierversuchen erstmals *in vivo* im Menschen proinflammatorische Effekte von Leptin beim Morbus Crohn. Neben der Induktion von TNF $\alpha$  übt Leptin auch im Menschen weitere pleiotrope Effekte auf Phänotyp, Funktion und Metabolismus von Immunzellen aus.

## Abstract (English)

A growing number of studies suggest a critical role for mesenteric adipose tissue in the pathophysiology of inflammatory bowel disease, especially in Crohn's disease. In Crohn's disease hypertrophic mesenteric adipose tissue encloses the inflamed small-intestinal segments as so called "creeping fat". So far, the exact significance of mesenteric adipose tissue in intestinal inflammation remains to be elucidated. An increased release of adipokines like leptin and adiponectin, though, has been shown to exert immunomodulatory effects in animal models and *in vitro*. However, *in vivo* data from humans regarding the role of these adipokines in intestinal inflammation has not yet been published.

Here we describe the, to our knowledge, first known case of a patient suffering from acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn's disease (AGLCD), with generalized lipodystrophy being an extremely rare disease and one of the very few indications for leptin substitution. We investigated the effects of treatment with recombinant *N*-methionylleptin (rLeptin) on the immune system and on intestinal inflammation in the AGLCD patient by deep immune-profiling using mass and flow cytometry as well as functional and metabolic analyses, while also comparing the observed immune phenotype with that of healthy controls and Crohn's disease patients.

Before rLeptin treatment, the AGLCD patient presented with active Crohn's disease, an absolute lack of serum leptin, normal to slightly lowered levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interferon  $\gamma$  production in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the control groups and with a distinct immune phenotype. Treatment with rLeptin led to an aggravation of Crohn's disease and to an early recurrence of intestinal inflammation following an ileocolic resection, which was accompanied by increased *ex vivo* TNF $\alpha$  production by T cells and monocytes, changes in the immune phenotype and altered immune cell metabolism in *in vitro* experiments. Subsequent initiation of anti-TNF $\alpha$  therapy with adalimumab resulted in endoscopic and clinical remission.

In line with previous *in vitro* and animal studies, this work provides the first human *in vivo* data on the pro-inflammatory effects of leptin in Crohn's disease. Aside from an induction of TNF $\alpha$ , leptin exerts further pleiotropic effects on immune cell phenotype, function and metabolism.



## 1. Manteltext

### 1.1. Einleitung

Beim Morbus Crohn (M. Crohn) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung mit einer Prävalenz von etwa 100 bis 200 pro 100.000 Einwohner in Deutschland<sup>2</sup>, wobei über die letzten Jahrzehnte die Inzidenzraten zunehmend waren<sup>3</sup>. Erstmals im Jahr 1932 durch Burrill B. Crohn *et al.* als regionale Ileitis beschrieben<sup>4</sup>, kommt es beim M. Crohn zu einer transmuralen Entzündung der Darmwand, wobei der Befall typischerweise segmental ausgeprägt ist und häufig das terminale Ileum betrifft, jedoch ist prinzipiell am gesamten Gastrointestinaltrakt eine Manifestation möglich. Ein weiteres Merkmal des M. Crohn ist die häufige Ausbildung von Fisteln, Abszessen und Stenosierungen. Die genaue Pathogenese des M. Crohn ist nicht eindeutig geklärt, aktuell wird von einem komplexen Zusammenspiel aus Umweltfaktoren, Immundysregulation und genetischen Faktoren ausgegangen. Diese intestinale Inflammation führt bei den betroffenen Patienten zu belastenden Symptomen wie abdominellen Schmerzen, Diarrhö, Gewichtsverlust, Fieber und Krankheitsgefühl. Unbehandelt würde der M. Crohn nicht nur zu einer immensen Einschränkung der Lebensqualität der Patienten führen, sondern wäre je nach Schwere des Verlaufs auch mit einer erhöhten Letalität bzw. Reduktion der Lebenserwartung verbunden<sup>5</sup>. Bei einer bisher noch nicht geklärten Pathogenese und folglich fehlenden kausalen Behandlungsoptionen besteht die Therapie des M. Crohn aktuell aus Immunsuppression/-modulation zur Reduktion der Entzündungsaktivität sowie chirurgischer bzw. interventioneller Therapie von Komplikationen wie Fisteln, Abszessen oder Stenosen<sup>2</sup>.

Eine weitere nahezu pathognomonische Beobachtung beim M. Crohn ist, dass es im Bereich der akut entzündeten Dünndarmabschnitte zu einer Proliferation des mesenterialen Fettgewebes kommt, welches diese Bereiche zu umschließen scheint und daher auch „Creeping Fat“ genannt wird<sup>6</sup>. Trotz vieler Arbeiten und Hypothesen zu diesem Thema ist die genaue Bedeutung dieses „Creeping Fat“ in der Pathogenese des M. Crohn zurzeit noch nicht geklärt<sup>7</sup>, was unter anderem auch an einer fehlenden Ausbildung von „Creeping Fat“ in Tiermodellen für intestinale Entzündung und den dadurch bedingten methodischen Schwierigkeiten in der experimentellen Untersuchung liegt<sup>8</sup>. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es im „Creeping Fat“ zur erhöhten Sekretion von Fettgewebshormonen, den sogenannten Adipokinen, kommt<sup>9</sup>. Für die bekannten Adipokine Leptin und Adiponektin konnte im Tierversuch bereits gezeigt werden, dass sie einen Einfluss auf intestinale Entzündungsvorgänge haben. So konnten Singh *et al.* zeigen, dass die pharmakologische Blockade von Leptin im *l110<sup>-/-</sup>* Mausmodell die Ausprägung der Kolitis abschwächt<sup>10</sup>. Dies fügt sich ein in frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, wonach Leptin-defiziente *ob/ob* Mäuse in einem Modell der experimentellen Kolitis ebenfalls einen schwächeren Verlauf zeigen<sup>11</sup> und der Transfer von Leptinrezeptor-defizienten T-Zellen im Transferkolitismodell zu

einem deutlich verzögert einsetzendem Krankheitsbild führt<sup>12</sup>. Für Adiponektin ist die Datenlage im Tiermodell dagegen nicht ganz eindeutig: Während einige Studien eine protektive Rolle nahelegen<sup>13-15</sup>, berichten andere Studien auch einen krankheitsfördernden Effekt<sup>16,17</sup>. *In vivo* Untersuchungen zur Rolle der Adipokine bei intestinaler Inflammation im Menschen gibt es dagegen unseres Wissens nach noch keine, sodass die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tierversuch auf den Menschen aktuell nicht als gesichert erscheint. Dies liegt unter anderem auch daran, dass Leptin das einzige Adipokin ist, welches beim Menschen überhaupt therapeutisch eingesetzt wird, und dass dessen Anwendung auf einige wenige, sehr seltene Krankheitsbilder beschränkt ist, wie die generalisierte Lipodystrophie oder einen angeborenen Leptin-Mangel<sup>18,19</sup>.

Bei der erworbenen generalisierten Lipodystrophie handelt es sich um ein sehr seltenes Krankheitsbild, von dem in der Literatur etwa 100 Fälle beschrieben sind<sup>20</sup>. Die Patienten leiden unter einem Verlust von subkutanem und viszeralem Fettgewebe, wobei der Verlust nahezu vollständig sein kann. Dies führt zu schwerwiegenden metabolischen Konsequenzen wie einem Typ II Diabetes mellitus mit schwerer Insulinresistenz und/oder Leberversagen im Rahmen einer Steatohepatitis, da sich Lipide bei fehlendem Fettgewebe in anderen Geweben wie z.B. der Leber ablagern<sup>21</sup>. Interessanterweise führt die Therapie mit rekombinantem Leptin bei diesen Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der metabolischen Stoffwechsellage und wird daher empfohlen<sup>18,21</sup>.

Wir haben in unserer Klinik nun den bisher einzig bekannten Fall eines Patienten mit erworbener generalisierter Lipodystrophie und kombiniertem M. Crohn (AGLCD, für Englisch: „acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn’s disease“) betreut. Da dieser Patient im Verlauf von uns eine Substitution mit rekombinantem *N*-Methionylleptin (rLeptin, Metreleptin) erhalten hat, bot sich uns die einmalige Chance aufbauend auf diesen Fall erstmals humane *in vivo*-Daten zur Rolle von Leptin bei intestinaler Inflammation zu erheben, indem wir mittels Massen- und Durchflusszytometrie unter anderem den Phänotyp und die Funktion von Immunzellen vor und nach rLeptin-Gabe untersucht, und die Ergebnisse mit kleinen Kohorten von gesunden Probanden und von M. Crohn-Patienten verglichen haben.

## **1.2. Methodik**

### **1.2.1. Probanden und Ethikvotum**

Von allen Studienteilnehmern wurden schriftliche Einwilligungen eingeholt. Die Durchführung der Studie wurde vom Ethikrat der Charité – Universitätsmedizin Berlin durch ein Ethikvotum genehmigt. Für die Durchführung der Exom-Sequenzierung wurden vom AGLCD-Patienten, seiner Mutter, seinem Bruder und seiner Schwester für diesen Zweck gesonderte, entsprechende schriftliche Einwilligungen eingeholt. Die Autoren der Studie haben sich an alle relevanten ethischen Richtlinien bei der Durchführung der Studie gehalten.

### *1.2.2. Isolierung von Immunzellen aus peripherem Blut*

Peripheres Blut von Probanden/Patienten wurde in Heparin-Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich) entnommen. Das Blut wurde mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) 1:2 verdünnt und folgend in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig auf Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml, Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Dichtegradientenzentrifugation geschichtet. Nach Zentrifugation (1200 g, 25 min, 20 °C) wurden die mononukleären Zellen (PBMCs, von Englisch „peripheral blood mononuclear cells“) als an der Grenzschicht zwischen Biocoll-Lösung und Blutplasma verbleibende Zellen isoliert und diese in RPMI 1640 Medium (ThermoFisher Scientific) mit 10 % fötalem bovinem Serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 50 Einheiten/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, USA), folgend als komplettes Zellmedium bezeichnet, gewaschen. Die Zellen wurden entweder direkt genutzt oder zur späteren Verwendung in RPMI 1640 Medium mit 20 % FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich) unter Verwendung des Mr. Frosty Gefrierbehälter (ThermoFisher Scientific) bei -80 °C eingefroren und nach vollständigem Gefrieren in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

### *1.2.3. Isolierung von Serumproben*

Peripheres Blut von Probanden/Patienten wurde in Serumröhrchen (Greiner Bio-One) entnommen. Nach Zentrifugation (1800 g, 7 min, 20 °C) wurde das Serum entnommen und bis zur weiteren Verwendung in kleineren Aliquots bei -80 °C eingefroren und gelagert.

### *1.2.4. Massenzytometrie*

Um die Immunphänotypen von gesunden Kontrollen, Patienten mit M. Crohn und dem Patienten mit AGLCD im Detail vergleichen zu können, haben wir uns der sogenannten Massenzytometrie bedient. Bei der relativ neuen Massenzytometrie werden ähnlich der Durchflusszytometrie Antigene auf oder in Zellen mit spezifischen Antikörpern „angefärbt“, allerdings sind im Gegensatz zur Durchflusszytometrie die Antikörper mit Isotopen verschiedener seltener Elemente gekoppelt anstatt mit fluoreszierenden Farbstoffen. Die Zellen werden nun einzeln mitsamt den gebundenen Antikörpern in eine Plasmawolke überführt und deren Zusammensetzung mittels Massenspektrometrie gemessen. Da die verwendeten Isotope auf natürliche Weise in Zellen nicht in relevanten Mengen vorkommen, kann aus den gemessenen Isotopsignalen jeweils darauf geschlossen werden, welche spezifischen Antikörper gebunden hatten und folglich welches Antigen auf bzw. in der Zelle präsent gewesen sein muss. Aus der Höhe des Signals kann auf die relative Häufigkeit der Expression des jeweiligen Antigens im Vergleich mit anderen Zellen geschlossen werden. Der Vorteil der Massenzytometrie gegenüber der Durchflusszytometrie liegt in einer höheren Anzahl der maximal gleichzeitig bestimmbaren Marker (aktuell ca. 40-50 versus maximal

etwa 20) sowie in einem deutlich geringeren Überlappen benachbarter Signale (sogenannter „Spillover“)<sup>22</sup>.

Im Detail wurden PBMCs von gesunden Kontrollen (n=5), Patienten mit M. Crohn (n=6) und dem Patienten mit der AGLCD (vor und nach 7 Tagen Leptin-Substitution) nach unserem kürzlich publizierten Protokoll verglichen<sup>23</sup>. Jeweils etwa  $2 \cdot 10^6$  PBMCs pro Probe wurden in einer Mischung aus Smart Tube Puffer (SmartTube Inc., San Carlos, USA) und 20 % bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS-Puffer für 11 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt bei -80 °C eingefroren und gelagert. Um nach Sammeln aller Proben diese zur Reduktion von Variabilität und zur Vereinfachung für die weiteren Schritte in ein Gefäß zusammenführen zu können, wurden alle Proben zunächst nach dem Auftauen mit dem Cell-ID 20-plex Pd Barcoding Kit (Fluidigm, South San Francisco, USA) mit einem individuellen Palladium-Isotopen Profil gekennzeichnet. Nach Zusammenführen der Proben erfolgte die Färbung mit zwei verschiedenen, teilweise überlappenden Antikörper-Panels (je 34 Marker), die funktionelle und phänotypische Oberflächen- sowie intrazelluläre Marker von Immunzellen enthielten. Die Antikörper wurden entweder bereits konjugiert gekauft (Fluidigm) oder mit dem MaxPar X8 Kit (Fluidigm) selbstkonjugiert (**Tabelle 1**). Dabei wurden zunächst die Oberflächenmarker in Zellpuffer-Lösung (0,5 % BSA und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure in PBS) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Für die Färbung der intrazellulären Marker wurden die Zellen mit dem eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben fixiert, permeabilisiert sowie folgend für 60 min bei 4 °C gefärbt. Es folgten die Inkubation in 2 % Formaldehyd-Lösung (ThermoFisher Scientific) über Nacht sowie am nächsten Tag die Färbung der Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Iridium-Interkalatorlösung (Fluidigm) zur Markierung von Desoxyribonukleinsäure (DNS). Nach Waschen mit Zellpuffer-Lösung gefolgt von zweimaligem Waschen mit doppelt destilliertem Wasser (Fluidigm) wurden die Proben nun an einem CyTOF2 Massenzytometer (Fluidigm) mit Helios Spezifikationen und Software Version 6.5.236 gemessen. Zur Kalibrierung und Kompensation von möglichen Änderungen in der Signalsensitivität während der Messung wurden hierbei EQ Four Element Calibration Beads (Fluidigm) zur Probe hinzugegeben. Zur Analyse der Primärdaten wurde Cytobank ([www.cytobank.org](http://www.cytobank.org), Cytobank Inc., Santa Clara, USA) verwendet, um manuell das Gate auf vitale Zellen zu setzen und die jeweiligen mit Palladium-Barcode versehenen Einzelproben zu entschlüsseln, sowie um mittels Barnes-Hut Implementation des t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) Algorithmus eine Reduktion der Multidimensionalität der Daten zu erhalten und diese mittels der Visualisierung des t-SNE (viSNE) in einem zweidimensionalen Graphen darstellen zu können<sup>24</sup>. In einem viSNE-Plot werden hierbei Zellen mit einer ähnlichen multidimensionalen Markerexpression in räumlicher Nähe als Gruppe dargestellt, und es besteht zusätzlich die Möglichkeit die Expression eines einzelnen Markers über Farbkodierung zu visualisieren.

Nach Setzen der Gates auf die durch viSNE ermittelten Zellgruppierungen erfolgte für diese die weitere Analyse.

**Tabelle 1.** Auflistung der verwendeten Antikörper-Panels in der Massenzytometrie. Bei Verwendung von Sekundärantikörpern gegen den Primärantikörper (hier ein *Kaninchen*-Antikörper) bzw. gegen die Fluorophore Fluorescein-5-isothiocyanat (*FITC*) und Phycoerythrin (*PE*) am Primärantikörper, wurden beide Antikörper unter dem Isotop des Sekundärantikörpers aufgeführt. Tabelle adaptiert nach „Supplementary Table 2“ aus den „Supplementary Information“ zu Ziegler *et al.*, *Nature Communications* (2019)<sup>1</sup>.

Panel A			Panel B		
Isotop	Antigen	Klon / Hersteller	Isotop	Antigen	Klon / Hersteller
<sup>142</sup> Nd	CD19	HIB19 / Fluidigm	<sup>142</sup> Nd	CD116	4H1 / Biolegend
<sup>143</sup> Pr	HLA-DR	L243 / Fluidigm	<sup>143</sup> Pr	HLA-DR	L243 / Fluidigm
<sup>144</sup> Nd	CD38	HIT2 / Fluidigm	<sup>144</sup> Nd	CD38	HIT2 / Fluidigm
<sup>145</sup> Nd	CD4	RPA-T4 / Fluidigm	<sup>145</sup> Nd	CD124	G077F6 / Biolegend
<sup>146</sup> Nd	TNF $\alpha$	Mab11 / Fluidigm	<sup>146</sup> Nd	CD64	10.1 / Fluidigm
<sup>147</sup> Sm	CD11c	Bu15 / Fluidigm	<sup>147</sup> Sm	CD11c	Bu15 / Fluidigm
<sup>148</sup> Nd	CD16	3G8 / Fluidigm	<sup>148</sup> Nd	CD16	3G8 / Fluidigm
<sup>149</sup> Sm	CCL2 (MCP-1)	5D3-F7 / Biolegend	<sup>149</sup> Sm	CCL2 (MCP-1)	5D3-F7 / Biolegend
<sup>150</sup> Nd	CD45	HI30 / Biolegend	<sup>150</sup> Nd	CD45	HI30 / Biolegend
<sup>151</sup> Eu	CD103	Ber-ACT8 / Fluidigm	<sup>151</sup> Eu	CD68	Y1/82A / Biolegend
<sup>152</sup> Sm	CD95 (Fas)	DX2 / Fluidigm	<sup>152</sup> Sm	CD83	HB15e / Biolegend
<sup>153</sup> Eu	CD62L	DREG-56 / Fluidigm	<sup>153</sup> Eu	IL-6	MQ2-13A5 / Biolegend
<sup>154</sup> Sm	CD3	UCHT1 / Fluidigm	<sup>154</sup> Sm	CD3	UCHT1 / Fluidigm
<sup>155</sup> Gd	CD56	B159 / Fluidigm	<sup>155</sup> Gd	CD54	HA58 / Biolegend
<sup>156</sup> Gd	CD195 (CCR5)	NP-6G4 / Fluidigm	<sup>156</sup> Gd	CD274 (PD-L1)	29E.2A3 / Fluidigm
<sup>158</sup> Gd	CD135	BV10A4H2 / Fluidigm	<sup>158</sup> Gd	CD135	BV10A4H2 / Fluidigm
<sup>159</sup> Tb	CD197 (CCR7)	G043H7 / Fluidigm	<sup>159</sup> Tb	GM-CSF	BVD2-21C11 / Fluidigm
<sup>160</sup> Gd	CD14	RMO52 / Fluidigm	<sup>160</sup> Gd	CD163	GHI/61 / Biolegend
<sup>161</sup> Dy	EMR1 (F4/80)	A10 / Bio-Rad	<sup>161</sup> Dy	CD36	5-271 / Biolegend
<sup>162</sup> Dy	CD8a	RPA-T8 / Fluidigm	<sup>162</sup> Dy	FOXP3	PCH101 / Fluidigm
<sup>163</sup> Dy	TGF $\beta$	TW4-2F8 / Biolegend	<sup>163</sup> Dy	TGF $\beta$	TW4-2F8 / Biolegend
<sup>164</sup> Dy	CD115	9-4D2-1E4 / Biolegend	<sup>164</sup> Dy	Arginase-1	658922 / Fluidigm
<sup>165</sup> Ho	T-bet ( <i>PE</i> )	4B10 / eBioscience	<sup>166</sup> Er	IL-10	JES3-9D7 / Fluidigm
	<i>PE</i>	PE001 / Fluidigm	<sup>167</sup> Er	CD197 (CCR7)	G043H7 / Fluidigm
<sup>166</sup> Er	IL-10	JES3-9D7 / Fluidigm	<sup>168</sup> Er	CD206 (MMR)	15-2 / Fluidigm
<sup>167</sup> Er	CD27	O323 / Fluidigm	<sup>169</sup> Tm	CD33	WM53 / Fluidigm
<sup>168</sup> Er	IFN $\gamma$	B27 / Fluidigm	<sup>170</sup> Er	CD86	IT2.2 / Biolegend
<sup>169</sup> Tm	CD33	WM53 / Fluidigm	<sup>171</sup> Yb	CCR2	K036C2 / Biolegend
<sup>170</sup> Er	CD86	IT2.2 / Biolegend	<sup>172</sup> Yb	CX3CR1	2A9-1 / Fluidigm
<sup>171</sup> Yb	CD192 (CCR2)	K036C2 / Biolegend	<sup>173</sup> Yb	CD40	5C3 / Biolegend
<sup>172</sup> Yb	CX3CR1	2A9-1 / Fluidigm	<sup>174</sup> Yb	IL-8 ( <i>FITC</i> )	E8N1 / Biolegend
<sup>173</sup> Yb	CD40	5C3 / Biolegend		<i>FITC</i>	FIT22 / Fluidigm
<sup>174</sup> Yb	PD-1	EH12.2H7 / Fluidigm	<sup>175</sup> Lu	ADRP ( <i>Kaninchen</i> )	polyklonal / Proteintech
				<i>Kaninchen</i>	polyklonal / Fluidigm
<sup>176</sup> Yb	IL-7R	A019D5 / Fluidigm	<sup>176</sup> Yb	TREM2	237920 / R&D System
<sup>209</sup> Bi	CD11b	ICRF44 / Fluidigm	<sup>209</sup> Bi	CD11b	ICRF44 / Fluidigm

Abkürzungen: ADRP = „Adipose differentiation-related protein“, CCL = C–C-Chemokin Ligand, CCR = C–C-Chemokin Rezeptoren, CD = „Cluster of Differentiation“, CD62L = CD62 Ligand, CX3CR1 = CX3C-Chemokin Rezeptor, 1, EMR1 = „Epidermal-growth-factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1“, FOXP3 = „Forkhead box P3“, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, HLA-DR = humanes Leukozytenantigen – Isotyp DR, IFN $\gamma$  = Interferon- $\gamma$ , IL = Interleukin, IL-7R = IL-7 Rezeptor, MCP1 = Monozyten chemoattraktives Protein 1, MMR = Makrophagen Mannose Rezeptor, PD1 = „Programmed cell death protein 1“, PD-L1 = „Programmed death“ Ligand 1, T-bet = „T-box expressed in T cells“, TGF $\beta$  = „Transforming growth factor  $\beta$ “, TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , TREM2 = „Triggering receptor expressed on myeloid cells 2“.

### 1.2.5. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden, wie unter „Massenzytometrie“ bereits erwähnt, Strukturen auf bzw. in Zellen mit spezifischen Antikörpern, an welche fluoreszierende Farbstoffe (Fluorophore wie Allophycocyanin (APC), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), gegebenenfalls auch als Tandem-Fluorophor mit Cyanin (Cy) 5.5 oder 7) gekoppelt sind, oder mit speziellen fluoreszierenden Farbstoffen (z.B. DNS-Interkalation) angefärbt. Diese Fluorophore haben jeweils bestimmte Erregungs- wie auch Emissionsspektren. Am Durchflusszytometer kann dadurch unter Verwendung von Lichtquellen mit spezifischen Wellenlängen und von Filtern, welche nur definierte Wellenlängen emittierten Lichts durchlassen, auf die jeweils auf einer bestimmten Zelle gebundenen Antikörper/Fluorophor-Komplexe geschlossen und damit die Expression von Markern bestimmt werden<sup>25</sup>.

Zum Vergleich von Phänotyp, Zytokinproduktion nach Stimulation und weiteren metabolischen bzw. funktionellen Markern wurden kryokonservierte PBMCs vom Patienten mit AGLCD, von gesunden Kontrollen und von Patienten mit M. Crohn aufgetaut und in komplettem Zellmedium gewaschen. Folgend wurden die Zellen entweder direkt mit Antikörpern gefärbt oder zuvor noch zur Messung der Zytokinproduktion stimuliert (*ex vivo* Stimulation). Zur *in vitro* Stimulation wurden die Zellen in komplettem Zellmedium unter Zusatz von 1 µg/ml Ionomycin (Sigma-Aldrich) und 20 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Sigma-Aldrich) für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, wobei nach 2 Stunden 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) als Golgi-Stopp zugegeben wurden. Zur Stimulation von Monozyten wurden statt Ionomycin/PMA bei sonst gleichem Protokoll 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS, Sigma-Aldrich) verwendet. Als Negativkontrollen wurden jeweils Proben ohne Zugabe von Ionomycin/PMA bzw. LPS inkubiert. Um später avitale Zellen und Zelltrümmer herausfiltern zu können, wurde zunächst eine Vitalfärbung mit den fixierbaren Farbstoffen Zombie Violet™ (BioLegend, San Diego, USA) bzw. LIVE/DEAD™ Fixable Aqua (ThermoFisher Scientific) in PBS für 20 min bei 20 °C durchgeführt. Bei der Färbung der Zellen mit den spezifischen Antikörpern erfolgte zunächst die Färbung der Oberflächenantigene in Zellpuffer-Lösung für 10 min bei 4 °C. Sofern für das jeweilige Experiment eine Färbung von intrazellulären Strukturen vorgesehen war, wurden die Zellen nach Oberflächenfärbung mit dem eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerprotokoll fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Färbung mit den spezifischen Antikörpern durchgeführt. Verwendete Antikörper (Klon, Fluorophor): CD3 (SK7, APC-eFluor780), CD3 (OKT3, APC), CD8a (SK1, PerCP-eFluor710), CD8a (RPA-T8, APC), CD56 (TULY56, APC bzw. eFluor450), CD80 (2D10.4, FITC), FOXP3 (PCH101, PE), Perforin (delta G9, PE-Cy7), RORγt (AFKJS-9, APC), T-bet (4B10, PE-Cy7) jeweils von eBioscience (San Diego, USA); CD3 (HIT3a, PE), CD3 (UCHT1, PerCP-Cy5.5), CD4 (RPA-T4, Brilliant Violet 510), CD8a (RPA-T8, FITC), CD11b (ICRF44, APC-Cy7), CD16 (3G8, PE), CD86 (IT2.2, Brilliant Violet 421), CD137 (4B4-1, PE), Granzym B

(GB11, Pacific Blue), IFN $\gamma$  (4S.B3, APC-Cy7), IL-17A (BL168, Brilliant Violet 421), IL-17A (BL168, APC-Cy7), TNF $\alpha$  (MAb11, PerCP-Cy5.5), jeweils von BioLegend; CD4 (RPA-T4, APC), CD14 (M $\phi$ P9, APC), CD25 (M-A251, PerCP-Cy5.5), CD44 (G44-26, PE-Cy7), IFN $\gamma$  (4S.B3, FITC), jeweils von BD Biosciences (San Jose, USA). Die Messung der Proben erfolgte an einem BD FACS Canto II Durchflusszytometer (3-Laser, -8-Farben-Konfiguration (4-2-2), BD Biosciences). Da es bei der Durchflusszytometrie zu überlappenden Emissionsspektren der verschiedenen Fluorophore kommt, muss zur korrekten Analyse der Signale eine Kompensation erfolgen, um die Anteile des Signals herauszurechnen, die durch andere Fluorophore als das im jeweiligen Kanal zu messende entstehen („Spillover“). Zur Durchführung dieser Kompensation wurden jeweils Einzelfärbungen der Antikörper/Fluorophor-Komplexe mit Invitrogen™ eBioscience™ OneComp eBeads (ThermoFisher Scientific) durchgeführt, sodass der „Spillover“ eines jeden Fluorophors bestimmt und herausgerechnet werden konnte. Die Analyse der Primärdaten erfolgte mit der FlowJo Software Version V10.1 (FlowJo, LLC, Ashland, USA).

#### 1.2.6. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Die Leptin-Konzentrationen im Serum von gesunden Kontrollen (n=5), Patienten mit M. Crohn (n=7) und dem Patienten mit AGLCD (verschiedene Zeitpunkte) wurden mittels ELISA unter Verwendung des Human Leptin DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) bestimmt. Beim ELISA kann die Konzentration eines Antigens gemessen werden, indem spezifische Antikörper binden, die wiederum direkt oder über einen zweiten Antikörper an ein Enzym gekoppelt sind und darüber ein Signal, klassischerweise einen Farbumschlag der Reaktionslösung, bewirken. Das Signal wird im Falle eines Farbumschlags mit einem Photometer gemessen und ist abhängig von der Konzentration des Antigens. Die Messung von Referenzproben mit bekannter Konzentration des Antigens erlaubt dann über Bildung einer Standardkurve die Bestimmung der Konzentration des jeweiligen Antigens in einer Probe<sup>26</sup>.

#### 1.2.7. *Messung des Gehalts an intrazellulären Lipiden*

Lipide werden intrazellulär hauptsächlich in sogenannten Lipidtropfen gespeichert<sup>27</sup>. Diese intrazellulären Lipide lassen sich in der Durchflusszytometrie mithilfe spezieller lipophiler Farbstoffe anfärben. Einer dieser Farbstoffe ist das sogenannte Boron-Dipyrrromethen (BODIPY) 493/503<sup>28</sup>. Zur Anfärbung und Messung des Gehalts an diesen Lipidtropfen wurden daher die Zellen für 30 min bei 37 °C in PBS mit 0,2  $\mu$ g/ml BODIPY™ 493/503 (ThermoFisher Scientific) inkubiert. Folgend wurden wie oben beschrieben eine Vitalitäts- und Oberflächenfärbung durchgeführt, und die Proben am Durchflusszytometer gemessen. Zur Auswertung wurden zunächst für die jeweiligen Zelltypen in einer Probe die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) für BODIPY bestimmt. Um mögliche Fehler durch Phänomene wie Autofluoreszenz der Zellen oder „Spillover“ zu vermeiden, wurde zum Vergleich des

Lipidgehalts jeweils die Differenz  $\Delta$ MFI berechnet aus der MFI der vollgefärbten Probe und der MFI einer mit allem außer BODIPY gefärbten Kontrolle derselben Probe.

#### 1.2.8. Bestimmung der zellulären Glukose-Aufnahme

Als wichtiges Substrat für den Energiestoffwechsel wird Glukose bedarfs- und metabolismusabhängig über Membrantransporter in Immunzellen aufgenommen. Diese Glukose-Aufnahme lässt sich experimentell mittels fluoreszierenden Glukose-Analoga wie 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) in der Durchflusszytometrie messen<sup>29</sup>. Zur Bestimmung der maximalen Glukose-Aufnahme wurden die Proben zunächst für 30 min bei 37 °C in PBS inkubiert, um die intrazellulären Glukosekonzentrationen auf vergleichbare Nüchternwerte anzugleichen. Daraufhin wurden 100  $\mu$ M 2-NBDG (ThermoFisher Scientific) für weitere 30 min bei 37 °C beigegeben. Nach erfolgter Oberflächen- und Vitalitätsfärbung erfolgte die Messung mittels Durchflusszytometrie. Die Bestimmung von  $\Delta$ MFI erfolgte wie für die BODIPY-Färbung beschrieben.

#### 1.2.9. Messung des Calcium-Einstroms in Immunzellen mittels Durchflusszytometrie

Der sogenannte Store-operated Calcium Entry (SOCE) ist ein Signalweg, bei dem es nach initialer Leerung der Calciumspeicher im endoplasmatischen Retikulum (ER) über die Interaktion von Membranmolekülen in ER und äußerer Zellmembran zu einem anhaltenden Calciumeinstrom von extrazellulär nach intrazellulär kommt, was über Mechanismen wie Calcium-sensitive Kinasen und Phosphatasen zu nachgeschalteten Effekten wie der Expression spezifischer Gene führt. In einigen Immunzellen, wie T-Zellen, spielt SOCE hierüber eine zentrale Rolle in der Steuerung von Aktivierung und Funktion<sup>30</sup>. Der Calciumeinstrom in Zellen kann über Calcium-sensitive Fluorophore wie Fluo-4, die abhängig von der Calciumkonzentration unterschiedlich stark fluoreszieren, mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden<sup>31</sup>. Zur Bestimmung des SOCE wurden daher PBMCs vom AGLCD-Patienten und von einer gesunden Kontrolle zunächst in komplettem Zellmedium unter Zugabe von 2  $\mu$ g/ml Fluo-4 AM (ThermoFisher Scientific) für 30 min auf Eis inkubiert, um das Zytoplasma der Zellen mit Fluo-4 anzureichern. Nach einer Oberflächenfärbung der Zellen wurden die Proben bis unmittelbar vor der jeweiligen Messung in einem kleinen Volumen (20  $\mu$ l) auf Eis im Dunkeln gelagert. Zur Messung wurde die Probe zunächst in Ringer-Lösung mit 0 mM Calcium gelöst. Nach Messung der Ausgangsfluoreszenzintensität  $f_0$ , wurde 1  $\mu$ M Thapsigargin (Merck) beigegeben, was eine Entleerung der Calciumspeicher im ER bewirkt, und die Messung sofort für 5 min fortgeführt, um eine vollständige Depletion des Calciums im ER zu erreichen. Da in der Ringer-Lösung zu diesem Zeitpunkt kein Calcium enthalten ist, kann noch kein Calcium-Einstrom von extrazellulär erfolgen. Nach diesen 5 min wurde durch Zugabe einer 4 mM Calcium enthaltenden Ringer-Lösung eine Calciumkonzentration von 2 mM in der Probe eingestellt und die Messung sofort für weitere 2 min fortgeführt, um den maximalen SOCE zu messen. Die Analyse der Primärdaten erfolgte mit der FlowJo Software



Version 8.8.7. Die Fluoreszenzintensität für Fluo-4 (gemittelt für einen Zeitraum von 10 s) zu einem gegebenen Zeitpunkt  $t$  wurde für jede Probe auf die Ausgangsfluoreszenzintensität  $f_0$  normalisiert ( $f/f_0$ ) und als Graph gegen die Zeit  $t$  aufgetragen.

#### *1.2.10. Bead-basierter durchflusszytometrischer Multiplex Immunoassay*

Bei den Bead-basierten durchflusszytometrischen Multiplex Immunoassays handelt es sich um eine Methode, mit der die Konzentrationen von mehreren Markern in Flüssigkeiten (z.B. Zytokinkonzentrationen im Serum) mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden können. Dabei sind für ein bestimmtes Antigen spezifische Antikörper an Mikropartikel („Beads“) gebunden. Bei Zugabe der zu analysierenden Flüssigkeit bindet das Antigen über die Antikörper an die spezifischen „Beads“. Nach Zugabe eines zweiten für das Antigen spezifischen Antikörpers, der an ein Fluorophor gebunden ist und an einer anderen Stelle des Antigens bindet, kann mittels Durchflusszytometrie die relative Häufigkeit des gebundenen Antigens pro „Bead“ als MFI gemessen werden. Durch die Messung von Kontrollproben mit bekannten Konzentrationen des Antigens kann eine Standardkurve bestimmt werden, aus der sich für jede MFI die entsprechende Konzentration errechnen lässt. Durch Variation von Größe der „Beads“ und von verwendeten Fluorophoren können verschiedene Populationen von „Beads“ in der Durchflusszytometrie sicher unterschieden werden und damit die Konzentrationen mehrerer Antigene in einer Probe gleichzeitig bestimmt werden<sup>32</sup>. Wir haben hier entsprechend das FlowCytomix Multiplex Kit von eBioscience™ (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben genutzt, um die Konzentrationen von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF), Monokin induziert von Gamma-Interferon (MIG), Monozyten chemotaktischem Protein 1 (MCP-1) und Makrophagen inflammatorischem Protein 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) in Serumproben des Patienten mit AGLCD vor und nach vier Tagen rLeptin-Therapie zu bestimmen. Gemessen wurde an einem BD FACS Canto II, die Auswertung erfolgte mit der FCAP Array™ Software V3.0 (BD Biosciences).

#### *1.2.11. Seahorse Analysen*

Der Metabolismus von Immunzellen ist eng mit deren Funktion und Differenzierung verknüpft<sup>33</sup>. Eine Möglichkeit zu untersuchen, welche Wege des Energiestoffwechsels Zellen aktuell benutzen, ist die Verwendung des Seahorse-Systems von Agilent (Santa Clara, USA). Unter Verwendung verschiedener Inhibitoren bzw. Reagenzien, welche an unterschiedlichen Stellen im Energiestoffwechsel die Reaktionswege blockieren oder entkoppeln, lassen sich durch Messung von pH-Wertveränderungen und Sauerstoffverbrauch Rückschlüsse auf die Energiegewinnung durch Lipolyse, Glykolyse oder Atmungskette ziehen<sup>34</sup>. Um den Einfluss von Leptin auf den Immunzellmetabolismus im AGLCD-Patienten experimentell zu untersuchen, wurden zunächst aus PBMCs eines gesunden Spenders mithilfe von MACS® („Magnetic Activated Cell Sorting“) MicroBeads positive Selektion Kits (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) je CD14<sup>+</sup> Monozyten, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Nach

der Isolierung, wurden die Monozyten *in vitro* in Makrophagen differenziert durch eine 6-tägige Inkubation mit 10 µg/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF, PeproTech, Rocky Hill, USA), während sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch 3-tägige Inkubation mit an die Zellkulturplatte gebundenen anti-CD3 (Klon OKT3; eBioscience) und anti-CD28 (Klon CD28.2; BD Bioscience) Antikörpern aktiviert und folgend für 4 Tage in Medium mit 20 ng/ml IL-2 (PeproTech) expandiert wurden. Um experimentell die Bedingungen im AGLCD-Patienten nachzustellen, war während des gesamten Experiments das verwendete Zellmedium RPMI 1640 Medium, welches mit 50 Einheiten/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin sowie mit 10 % Serum vom AGLCD-Patienten vor bzw. unter rLeptin-Substitution (- bzw. +rLeptin), Serum vom AGLCD-Patienten mit *in vitro*-Substitution von 1 µg/ml rekombinantem Leptin (PeproTech) oder 10 % Serum von einem gesunden Spender versetzt wurde. Nach obiger 6- bzw. 7-tägiger Inkubation erfolgte die Messung von Sauerstoffverbrauchsrate (OCR von Englisch „Oxygen Consumption Rate“) und extrazellulärer Azidifizierungsrate (ECAR) mit einem Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent) unter Verwendung des Cell Mito Stress Test Kit (Agilent). Die Messung erfolgte für alle Gruppen jeweils mindestens in technischen Triplikaten.

#### 1.2.12. Histopathologie

Paraffin-fixierte Gewebelöcke aus Darmresektaten des AGLCD-Patienten sowie von M. Crohn Patienten wurden durch die Zentrale Biomaterialbank der Charité – Universitätsmedizin Berlin bereitgestellt. Zur mikroskopischen Analyse wurden dünne Schichten von den Gewebelöcke geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin oder immunhistochemischen Methoden (Antikörper: CD45, Klon 2B11 und PD7/26 von Dako (Agilent); CD11b, Klon EP1245Y von Abcam (Cambridge, Großbritannien); CD206, Klon 5C11 von LifeSpan BioSciences (Seattle, USA); TNFα, Klon M1-C4 von Sigma-Aldrich; iNOS, polyklonal (Kaninchen) von Invitrogen (Carlsbad, USA); CD86, polyklonal (Ziege) von R&D Systems; ADRP, polyklonal (Kaninchen) von Proteintech (Rosemont, USA); CD163, Klon 10D6 von Novocastra (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)) gefärbt. Je nach Färbung wurden 6 bis 11 Proben von 3 bis 7 M. Crohn-Patienten (bei manchen Patienten Proben aus zwei verschiedenen Lokalisationen) mit der Probe des AGLCD-Patienten verglichen. Die Detektion der Fluoreszenz-Signale der Antikörper erfolgte mit dem Opal 4-Color Manual IHC Kit (PerkinElmer, Waltham, USA). Die multispektralen Aufnahmen der gefärbten Proben wurden mit einem Vectra® 3 Imaging System (PerkinElmer) durchgeführt. Dabei wurden die positiven Zellen in 10 High-Power Feldern (hpf; visuelles Feld bei 400-facher Vergrößerung) mit der inForm Software (PerkinElmer) bestimmt. Alle Analysen wurden primär verblindet durch das iPATH.Berlin durchgeführt. Die gezeigten Bilder wurden mit einem Axiolmager Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

### 1.2.13. Scratch Assays

Die sogenannten Scratch Assays werden als *in vitro* Modell zur epithelialen Wundheilung verwendet. Dabei wird in einer Epithelzellschicht durch einen Kratzer (Englisch „Scratch“) ein Defekt erzeugt, welcher sich dann über Mechanismen wie Zellteilung und -migration verschließt und dadurch ein Modell der Wundheilung darstellt<sup>35</sup>. Um die intestinale Wundheilung unter Leptin-Einfluss zu untersuchen wurden humane T84 Kolon-Epithelzellen (ATCC, Manassas, USA) in Zellkulturplatten in DMEM „high-glucose“ Medium (4,5 g/l Glukose; von ThermoFisher Scientific) mit 10 % FBS und 50 Einheiten/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin als einlagige Zellschicht kultiviert und nach Wechsel auf serumarmes Medium (Zugabe von 0,1 % FBS statt 10%) mit einer kleinen Pipettenspitze je Well ein Scratch erzeugt. Folgend wurden entweder 1 µg/ml rekombinantes humanes Leptin (Peprotech) oder nur das Vehikel (PBS + 0,5 % BSA) zugegeben. Nach Anlage der Scratches wurden jeweils mit der AxioCam 105-Farben Kamera auf einem Primovert Mikroskop (beide Carl Zeiss AG) ein Bild an einer bestimmten Stelle des Scratches angefertigt. Frisches Medium wurde vorsichtig nach 4 Tagen zugegeben. Nach 8 Tagen bzw. sobald der erste Scratch nahezu verschlossen war, wurden erneut Bilder von derselben Stelle des Scratches gemacht. Unter Verwendung des MiToBo Scratch Assay Analyzer Plugins der ImageJ Software bzw. unter manueller Korrektur bei offensichtlichen Fehlern durch die Analyse des Plugins wurden jeweils die Flächen der Scratches bestimmt und der Unterschied zwischen Ende und Beginn, also die innerhalb des Experiments von den Zellen überwachsene Fläche  $\Delta Area$ , bestimmt. Diese  $\Delta Area$  wurde zur Analyse auf den Durchschnittswert  $\Delta Area_{Mittel}$  der Kontrollgruppe normalisiert.

### 1.2.14. Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Über Epithelzellschichten lässt sich *in vitro* ein elektrischer Widerstand als Anhalt für deren Durchlässigkeit messen, der sogenannte transepitheliale elektrische Widerstand (TEER)<sup>36</sup>. Zur Untersuchung des Einflusses von Leptin auf den TEER wurden humane T84 Kolon-Epithelzellen (ATCC) auf Transwell-Einlagen mit 5 µm Porengröße (Sigma-Aldrich) in DMEM „high-glucose“ Medium mit 10 % FBS und 50 Einheiten/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert und bei Experimentbeginn 1 µg/ml rekombinantes humanes Leptin (Peprotech) oder Vehikel (PBS+ 0,5 % BSA) zugegeben. Um einen Epithelschaden zu induzieren und den Einfluss von Leptin in dieser Entzündungssituation zu untersuchen, wurden jeweils noch 2 ng/ml rekombinantes humanes TNF $\alpha$  und 2 ng/ml Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (beide von Peprotech) zugegeben. Der elektrische Widerstand R über dem Epithel wurde zu Experimentbeginn, nach 24 h sowie nach 48 h zwischen einer Elektrode im Well und einer Elektrode im Transwell gemessen. Der TEER errechnete sich aus dem gemessenen R nach Abzug des Widerstands  $R_0$  von 130  $\Omega$ , der über einem Transwell ohne kultivierte Zellen entfällt, und folgender Multiplikation mit der Fläche des Transwells (0,6 cm<sup>2</sup>). Abschließend

wurden die jeweiligen TEER auf den jeweiligen Ausgangs-TEER bei Experimentbeginn normalisiert.

#### *1.2.15. Statistik und graphische Darstellung*

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte jeweils mit GraphPad Prism Version 7.00 (GraphPad Software, San Diego, USA). Falls nicht explizit anders angegeben erfolgte die Überprüfung auf statistische Signifikanz mittels zwei-seitigen ungepaarten *t*-Tests, diese aufgrund des eher hypothesengenerierenden Charakters der betreffenden Experimente je ohne Korrektur für multiple Vergleiche. Für die Seahorse-Analysen wurde ein „two-way ANOVA“ mit Post-hoc Tests, die gegen „AGLCD (-rLeptin)“ als Kontrolle verglichen haben, unter Verwendung der Holm-Sidak Korrektur für multiple Vergleiche angewendet. Eine statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn  $p < 0,05$  war.

#### *1.2.16. Exom-Sequenzierung*

Die DNS des AGLCD-Patienten sowie von dessen gesunder Mutter, Bruder und Schwester wurde aus peripherem Blut extrahiert. Die Exom-Anreicherung wurde mit dem IDT xGen Exome Research Panel Version 1.0 durchgeführt gefolgt von einer 2 x 75 Basenpaare paired-end Sequenzierung an einem Illumina (San Diego, USA) HiSeq 3000. Die gemessenen Sequenzen wurden gegen das humane Referenz-Genom hg19 mittels Burrows-Wheeler Alignment Tool<sup>37</sup> aufgetragen, sortiert sowie daraufhin in das BAM-Format konvertiert und mit dem SAMtools Programm<sup>38</sup> katalogisiert. Folgend wurden mit dem Genome Analysis Toolkit<sup>39</sup> Duplikate entfernt, lokale Realignments von Sequenzen im Bereich um Indel-Sequenzen und eine Base Quality Score Rekalibrierung nach den Best-Practice-Empfehlungen durchgeführt. Weiterhin erfolgten daraufhin das sogenannte Variant Calling und die Variant Quality Score Rekalibrierung. Die Bewertung (Variant Annotation) und das Filtern von genetischen Varianten wurde mit der Alissa Interpret Plattform (Agilent) vorgenommen. Die Exom-Sequenzierung erfolgte am Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

### **1.3. Ergebnisse**

MRT-Untersuchungen des AGLCD-Patienten zeigten im Vergleich zu einer Kontrollpatientin mit M. Crohn das Fehlen von subkutanem und viszeralem Fettgewebe, einschließlich des „Creeping Fat“, und konsekutiv war auch die Leptinkonzentration im Serum kaum messbar. Es sind keine Familienangehörigen mit ähnlicher Erkrankung bekannt, und es konnte keine bekannte, Lipodystrophie-*verursachende* Mutationen nachgewiesen werden. Ein detaillierter Fallbericht kann der zur Dissertation zugehörigen Publikation und deren ergänzenden Informationen entnommen werden<sup>1</sup>. In Kürze: Der Patient war im Alter von 4 Jahren an einer generalisierten Lipodystrophie erkrankt und mit 11 Jahren manifestierte sich ein M. Crohn. Als Folge der Lipodystrophie entwickelte sich ein Typ II Diabetes mellitus mit extremer Insulinresistenz und aufgrund einer Nicht-alkoholischen Steatohepatitis, verursacht durch die vermehrte Ablagerung von Lipiden in der Leber bei Fehlen des Fettgewebes als Lipidspeicher,

musste sich der Patient im Alter von 15 Jahren einer Lebertransplantation unterziehen. Mit seit mehreren Monaten aus unbekanntem Gründen pausierter Leptin-Therapie stellte sich der Patient mit aktivem M. Crohn im Alter von 21 Jahren in unserer Klinik vor.

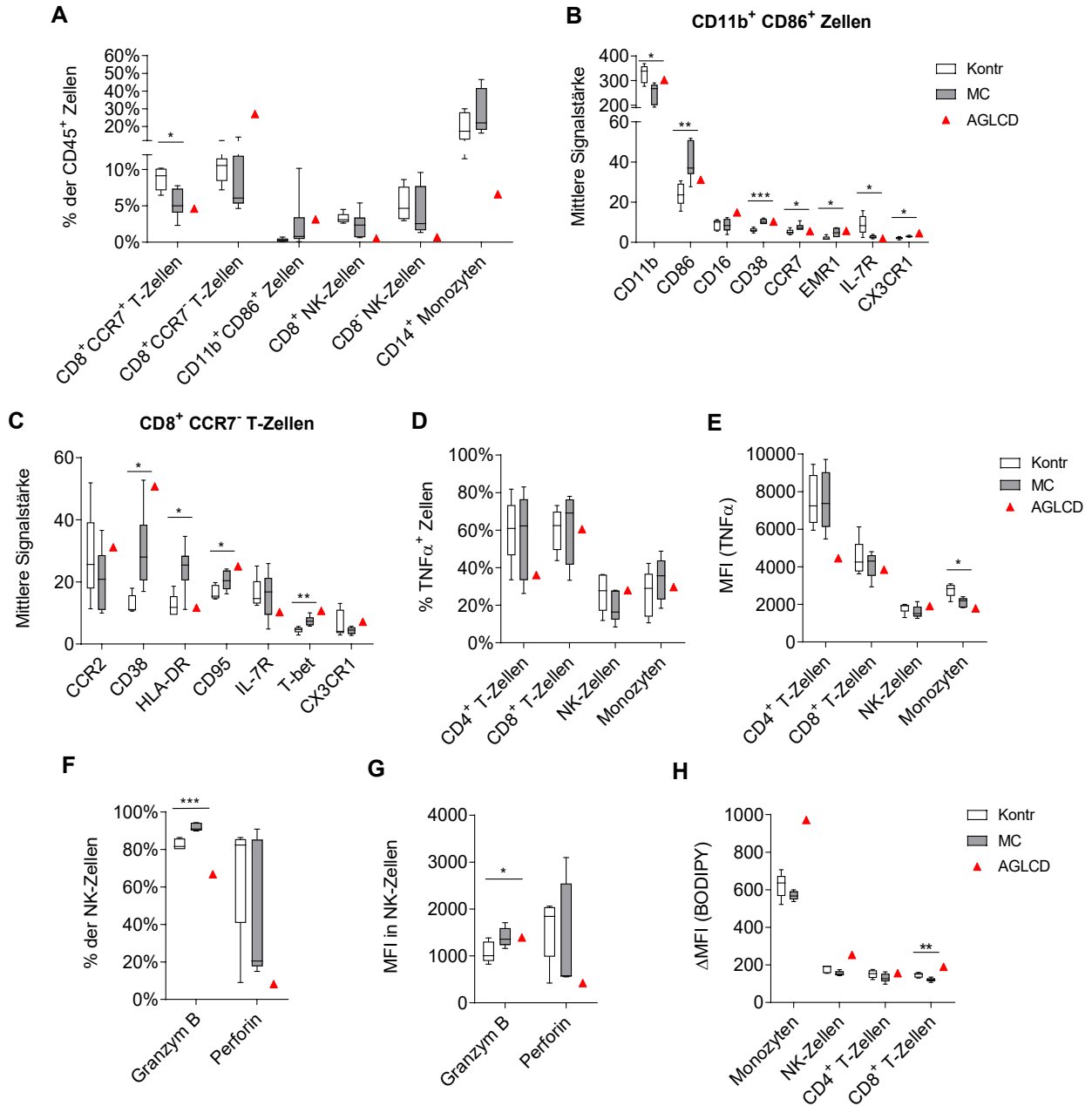
Um zunächst die Effekte des abwesenden Fettgewebes auf den Immunphänotyp unseres Patienten abschätzen zu können und zusätzlich M. Crohn-bedingte Einflüsse auf Immunzellen identifizieren zu können, wurden mittels Massenzytometrie sowohl die relative Häufigkeit verschiedener Immunzellsubtypen als auch die Expression bestimmter Marker (**Tabelle 1**) im peripheren Blut des Patienten mit AGLCD mit gesunden Kontrollen (n=5) und Patienten mit M. Crohn (n=6) verglichen. Hierbei zeigten sich sowohl bei dem Patienten mit der AGLCD als auch bei Patienten mit M. Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine geringere Anzahl von CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut (p<0,05 für gesund versus M. Crohn), während der Anteil der CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen jeweils tendenziell erhöht war. Dagegen waren bei dem Patienten mit AGLCD sowohl im Unterschied zu gesunden Kontrollen als auch zu Patienten mit M. Crohn die relativen Zellzahlen von CD56<sup>+</sup> natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und CD14<sup>+</sup> Monozyten deutlich reduziert (**Abbildung 1A**). Weiterhin war die Expression von CD38 auf CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen sowie T- und NK-Zellen des Patienten mit AGLCD erhöht (exemplarisch **Abbildung 1B** und **C**), wohingegen die Expression von CCR7 auf T- und B-Zellsubtypen erniedrigt war. Außerdem sahen wir diverse statistisch signifikante Unterschiede in der Expression von Markern zwischen Patienten mit M. Crohn und gesunden Kontrollen, unter anderem etwa eine erhöhte CD38-Expression auf CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T-Zellen (p<0,05) und CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen (p<0,001), eine erhöhte Expression von HLA-DR, CD95 (je p<0,05) und T-bet (p<0,01) auf CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T-Zellen, eine gesteigerte EMR1-Expression auf CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen (je p<0,05) sowie eine erhöhte CCR7-Expression auf CD19<sup>+</sup> B-Zellen (p<0,05).

Zum Vergleich der Immunzellfunktion wurde die Expression von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  nach *ex vivo* Stimulation der Zellen gemessen. Es wurden vergleichbare Anteile Zytokin-produzierender Monozyten, T- und NK-Zellen in den drei Gruppen beobachtet, ebenso waren die MFI-Werte der Zytokin-produzierenden Zellen als Marker für die Menge der Zytokinproduktion der Zellen vergleichbar, mit Ausnahme einer etwas reduzierten MFI von TNF $\alpha$  in TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Monozyten von Patienten mit M. Crohn (p<0,05) und des Patienten mit der AGLCD. Vergleichbar war auch die MFI in TNF $\alpha$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Patienten mit AGLCD reduziert (**Abbildung 1D** und **E**). Dagegen konnten in unserem Patienten mit AGLCD im Vergleich mit den beiden Kontrollgruppen eine reduzierte Frequenz von Perforin- bzw. Granzym B-produzierenden NK-Zellen, und für Perforin in diesen auch eine niedrigere Gesamt-Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich ein höherer Anteil an Granzym B-produzierenden Zellen (p<0,001) sowie eine erhöhte Expression von Granzym B (p<0,05) in den NK-Zellen der Patienten mit M. Crohn verglichen mit den gesunden Kontrollen (**Abbildung 1F** und **G**).

Außerdem lieferte der Vergleich mit einer gesunden Kontrolle im primären Durchflusszytometrie-Plot für die NK-Zellen des Patienten mit AGLCD ein untypisches Expressionsmuster von CD56/CD16. Als weitere funktionelle Untersuchung der Immunzellfunktion wurde der Calcium-Einstrom in Immunzellen, der sogenannte SOCE, zwischen Lymphozyten einer gesunden Kontrolle und dem Patienten mit AGLCD verglichen, wobei sich für CD8<sup>+</sup> T-Zellen unseres Patienten eine reduzierte SOCE-Kapazität zeigte. Eine Messung des intrazellulären Lipidgehalts von Immunzellen mittels BODIPY-Färbung in der Durchflusszytometrie konnte bei Proben des Patienten mit der AGLCD einen erhöhten Lipidgehalt von CD14<sup>+</sup> Monozyten sowie von T- und NK-Zellen nachweisen. Hier zeigte sich auch eine Tendenz zu leicht niedrigerem Lipidgehalt der Immunzellen der Patienten mit einem M. Crohn verglichen mit den gesunden Kontrollen, die für CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ) war (**Abbildung 1H**).

Da der Patient mit der AGLCD unter extremer Insulinresistenz litt und sich in Lipodystrophie-Patienten die Substitution von Leptin als effektiv in der Therapie der resultierenden metabolischen Probleme erwiesen hat<sup>18</sup>, entschieden wir uns die Therapie mit rLeptin wieder zu beginnen, welche initial im „Compassionate Use Programm“ der Universität Leipzig begonnen worden war. Vier Tage nach Beginn der rLeptin-Therapie waren im Serum dieses Patienten hohe Leptin-Spiegel nachweisbar. Klinisch führte die rLeptin-Therapie zu einer Reduktion des täglichen Insulinbedarfs um etwa den Faktor 10 und zu einer Abnahme der Triglyzerid- und Cholesterolspiegel im Serum. Weiterhin waren die intrazellulären Lipidablagerungen gemessen mit BODIPY-Färbung in den Immunzellen dieses Patienten nach rLeptin-Gabe rückläufig (**Abbildung 2A**), während dazu passend in der Massenzytometrie ein Rückgang der Expression des „Adipose Differentiation-related Protein“ (ADRP), einem Hüllprotein der intrazellulären Lipidtröpfchen, gemessen wurde (**Abbildung 2B**). Bei den Messungen zur Immunzellfunktion zeigten sich unter rLeptin-Therapie eine gesteigerte Produktion von TNF $\alpha$  nach *ex vivo* Stimulation von Monozyten und T-Zellen (**Abbildung 2C**) sowie eine erhöhte Expression von Perforin in NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Bezüglich der Immunzellzusammensetzung im peripheren Blut, konnte unter rLeptin-Substitution eine deutliche Expansion der CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, während der Anteil der CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T-, der CD19<sup>+</sup> B- sowie der CD8<sup>+</sup> NK-Zellen abnahm. Für NK-Zellen änderte sich außerdem das Expressionsmuster von CD56, mit einem unter der rLeptin-Therapie geringeren Anteil an CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und mehr CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Die Analyse unstimulierter Immunzellen mittels Massenzytometrie lieferte darüber hinaus viele weitere Veränderungen der Immunzellphänotypen nach rLeptin-Gabe, welche zur einfacheren Betrachtung als Heatmaps dargestellt wurden, die in Rot eine erhöhte und in Gelb eine

reduzierte Expression des Markers im jeweiligen Zelltyp anzeigt (**Abbildung 2B**). Unter anderem konnten eine erhöhte Expression von CD86 in B-, NK-, CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Zellen sowie eine erniedrigte Expression von Arginase-1 in CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden. Weiterhin war die Expression von CD38 in T-, NK- und



**Abbildung 1** zeigt exemplarisch einige Ergebnisse aus der Immunphänotypisierung im peripheren Blut von gesunden Kontrollen (Kontr), der Patienten mit Morbus Crohn (MC) und des Patienten mit erworbener generalisierter Lipodystrophie und kombiniertem Morbus Crohn (AGLCD). (**A-C**) Massenzytometrische Analyse der relativen Zellzahlen (**A**) im Blut und der relativen Expression (**B** und **C**) verschiedener Marker in zwei der Zelltypen (Kontr: n=5; MC: n=6). (**D-H**) Analyse von Immunzellfunktion und -phänotyp mittels Durchflusszytometrie. Anteil TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen (**D**) und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in diesen (**E**) nach 4-stündiger *ex vivo* Stimulation mit Ionomycin/PMA bzw. LPS (Kontr: n=6 für T- und NK-Zellen bzw. n=5 für Monozyten; MC: n=5 für alle Zelltypen). Der Anteil von Granzym B<sup>+</sup> und Perforin<sup>+</sup> NK-Zellen und die jeweilige MFI sind in **F** bzw. **G** dargestellt (Kontr: n=5; MC: n=5). **H** zeigt den intrazellulären Lipidgehalt gemessen als MFI von BODIPY (Kontr: n=5; MC: n=5). Boxen zeigen die 25. bis 75. Perzentile, Whisker die kleinsten bzw. größten Werte, der Strich in der Box ist der Median. Zweiseitige, ungepaarte t-Tests ohne Korrektur für multiple Vergleiche. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Abbildung adaptiert nach Ziegler *et al.*, *Nature Communications* (2019)<sup>1</sup>.

CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen reduziert, während die Expression von IL-7-Rezeptor (IL-7R) in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> Zellen zunahm. Die Analyse der Serumkonzentrationen einiger proinflammatorischer Zytokine vor und nach Beginn der rLeptin-Gabe ergab einen Anstieg von G-CSF, MIG und MIP-1 $\beta$ .

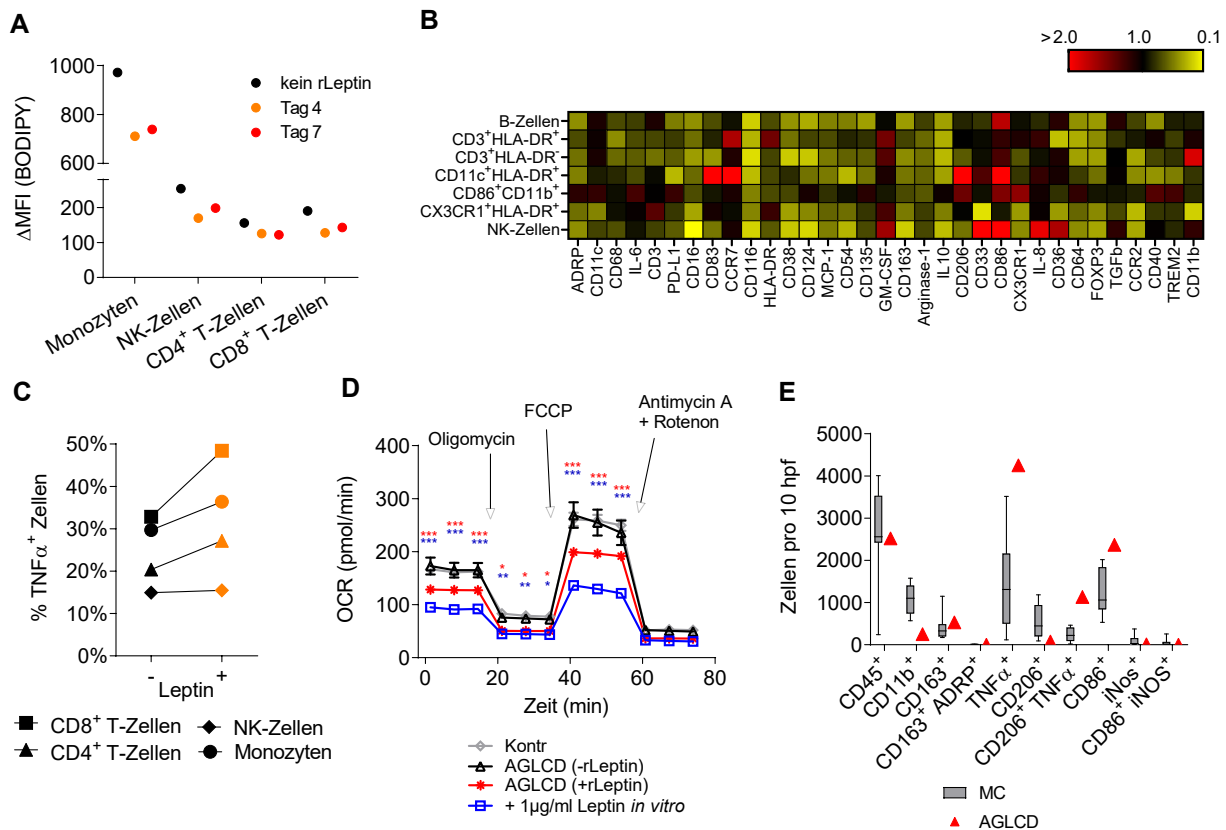
Der Immunzellmetabolismus wurde mittels Seahorse-Analysen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass *in vitro* differenzierte Makrophagen, welche mit Serum dieses Patienten nach Beginn der rLeptin-Therapie bzw. mit Serum dieses Patienten unter *in vitro* Zugabe von Leptin inkubiert wurden, in statistisch signifikant geringerem Maße die oxidative Phosphorylierung, gemessen als OCR, benutzten als Makrophagen, die mit Serum des AGLCD-Patienten vor rLeptin-Therapie inkubiert wurden (**Abbildung 2D**). Auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten bei obigem Versuchsaufbau Zeichen eines veränderten intrazellulären Metabolismus.

Zur Untersuchung eines möglichen direkten Einflusses von Leptin auf die Enterozyten des Darms, wurde ein *in vitro* Scratch Assay mit humanen T84 Zellen durchgeführt, welcher als Modell zur Wundheilung den Verschluss eines Kratzers in einer Zellschicht misst. Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ), etwas schnellere Verschlussrate bei Zugabe von 1  $\mu\text{g/ml}$  Leptin zum Zellmedium.

Aufgrund von anhaltend starker Entzündungsaktivität des M. Crohn unter rLeptin-Gabe und vorbestehenden Fisteln und Stenosen sowie der Entwicklung eines Abszesses wurde letztendlich die Entscheidung zu einer Rest-Proktokolektomie mit terminalem Ileostoma getroffen. Histopathologisch zeigten sich in allen untersuchten Segmenten starke Entzündungszeichen. In der Immunfluoreszenz wurde beim Patienten mit AGLCD, auch in Relation zu Proben anderer Patienten mit M. Crohn, eine hohe Infiltration mit TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen und mit CD86<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen (**Abbildung 2E**).

Da unser Patient auch nach der Resektion rasch wieder ein intestinales Entzündungsgeschehen entwickelte, wir aber angesichts der metabolischen Situation des Patienten möglichst die rLeptin-Therapie fortführen wollten, entschieden wir uns in Anbetracht unserer Beobachtungen von erhöhter TNF $\alpha$ -Produktion unter der rLeptin-Therapie zu einem Therapieversuch mit dem TNF $\alpha$ -Antikörper Adalimumab. Dies resultierte sowohl klinisch als auch in Kontrollendoskopien in einer auch nach über sechs Monaten weiter anhaltenden Remission des M. Crohn. Die Induktion der Remission war weiterhin assoziiert mit reduzierter TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Produktion in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach *ex vivo* Stimulation sowie einer erhöhten Anzahl von FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut des Patienten.





**Abbildung 2** zeigt die beobachteten Effekte der Leptin-Substitution auf die Immunzellen des Patienten mit erworbener generalisierter Lipodystrophie und kombiniertem Morbus Crohn (AGLCD). **(A)** Intrazellulärer Lipidgehalt gemessen mittels BODIPY-Färbung vor bzw. unter rLeptin-Therapie. **(B)** Heatmap von in der Massenzytometrie beobachteten relativen Veränderungen der Expression verschiedener Marker (Panel B) nach Gabe von rLeptin über 7 Tage im Vergleich zu vor der rLeptin-Gabe, wobei rot eine Zunahme und gelb eine Abnahme der relativen Expression darstellt. **(C)** Anteil der TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen nach 4-stündiger *ex vivo* Stimulation mit Ionomycin/PMA bzw. LPS vor und 4 Tage nach rLeptin-Gabe. **(D)** Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) in der Seahorse-Analyse von *in vitro* differenzierten Makrophagen eines gesunden Spenders, welche in Medium mit Zugabe von Serum einer gesunden Kontrolle (Kontr) oder Serum des Patienten mit AGLCD vor (-rLeptin) bzw. unter rLeptin-Therapie (+rLeptin) bzw. unter Zugabe von Leptin *in vitro* inkubiert wurden. Je Gruppe mindestens technische Triplikate. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittels. Varianzanalyse (Two-way ANOVA) mit Post-hoc Tests unter Holm-Sidak-Korrektur gegen „AGLCD -rLeptin“ als Kontrolle. **(E)** Anzahl von Zellen mit Expression bestimmter Marker pro 10 High-Power Feldern (hpf) in intestinalen Gewebeschnitten von Patienten mit Morbus Crohn (MC, 11 Proben von n=7 verschiedenen Patienten (CD45, CD163, ADRP) bzw. 9 Proben von n=6 verschiedenen Patienten (TNF $\alpha$ , CD206) bzw. 6 Proben von n=3 verschiedenen Patienten (CD11b, CD86, iNOS) wurden verglichen) sowie vom Patienten mit AGLCD. Boxen zeigen die 25. bis 75. Perzentile, Whisker die kleinsten bzw. größten Werte, der Strich in der Box ist der Median. FCCP = Trifluoromethoxy-carbonylcyanid-phenylhydrazon. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. Abbildung adaptiert nach Ziegler *et al.*, *Nature Communications* (2019)<sup>1</sup>.

#### 1.4. Diskussion

Zusammenfassend lassen sich aus den Beobachtungen dieser Studie neue Einblicke in die komplexe Rolle des Fettgewebes bei intestinaler Entzündung und in die Effekte von Leptin auf das Immunsystem im Menschen gewinnen. So deuten die in der Massen- und Durchflusszytometrie beobachteten Unterschiede zwischen dem Patienten mit der AGLCD und sowohl Patienten mit einem M. Crohn als auch gesunden Kontrollen zunächst darauf hin, dass es durch den Mangel an Fettgewebe zu einem veränderten Immunphänotyp in diesem Patienten kommt, am ehesten bedingt durch die Abwesenheit von Adipokinen wie Leptin und

Adiponektin sowie metabolischen Veränderungen. Dass der begleitende M. Crohn dieses Patienten bereits vor rLeptin-Gabe eine so schwere Ausprägung zeigt trotz der Abwesenheit von „Creeping Fat“, werten wir als Hinweis auf eine in ihrer Gesamtheit eher protektive Funktion von „Creeping Fat“ in der Pathogenese des M. Crohn. Dagegen legen die nach Substitution von rLeptin beobachteten Effekte wie eine klinische Verschlechterung des M. Crohn, die Zunahme der TNF $\alpha$ -Produktion, die hohe Infiltration von TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen in die Mukosa dieses Patienten und das folgende Ansprechen auf die TNF $\alpha$ -Antikörper Therapie eine TNF $\alpha$ -vermittelte, proinflammatorische Rolle von Leptin bei intestinaler Entzündung nahe. Dies fügt sich in Beobachtungen von Farooqi *et al.* ein, die zeigen konnten, dass Leptin Substitution in drei Patienten mit kongenitalem Leptin-Mangel zu erhöhter T-Zellproliferation und Zytokinproduktion führt, was zuvor eingeschränkt war. Bei fehlenden inflammatorischen Komorbiditäten wurden hier jedoch keine klinischen *in vivo* Entzündungsreaktionen beobachtet<sup>40</sup>. In einer weiteren Studie mit zehn Lipodystrophie Patienten berichteten Oral *et al.* von einer gesteigerten TNF $\alpha$ -Produktion in PBMCs unter Leptin-Therapie, ohne dass hier eine Induktion oder Verschlechterung einer entzündlichen Erkrankung berichtet wurde<sup>41</sup>. Unsere Beobachtungen deuten in diesem Kontext darauf hin, dass bei einer aktuell aktiven entzündlichen Komorbidität/Erkrankung die Gabe von rLeptin auch klinisch zu einer Verschlechterung von jener führen kann. Dies wird gestützt durch den Bericht über Verschlechterung einer membranoproliferativen Glomerulonephritis in zwei Patienten mit generalisierter Lipodystrophie innerhalb einer Studie, welche die Effekte von rLeptin auf die Nierenfunktion untersucht hat<sup>42</sup>. Die von uns beobachteten krankheitsfördernden Effekte von Leptin beim M. Crohn decken sich ebenfalls mit Untersuchungen aus dem Mausmodell, wonach Leptin bei experimentellen Koliden proinflammatorische Effekte hat und eine Blockade bzw. das Fehlen von Leptin den Verlauf abschwächt<sup>10-12</sup>. Unsere Studie scheint die Gültigkeit dieser tierexperimentellen Erkenntnisse daher erstmalig für den Menschen zu bestätigen. Die Diskrepanz zwischen der beobachteten proinflammatorischen Wirkung von Leptin und der von uns oben als insgesamt eher protektiv eingeordneten Rolle des „Creeping Fat“ könnte sich durch die Effekte anderer Adipokine, z.B. Adiponektin, bzw. insgesamt durch das Mikromilieu an humoralen und nutritiven Faktoren innerhalb des mesenterialen Fettgewebes erklären lassen<sup>43,44</sup>. Weiterhin könnten direkte Effekte von Leptin auf Enterozyten eine der proinflammatorischen Wirkung von Leptin entgegenwirkende Rolle spielen, wofür die Ergebnisse des Scratch Assays und weitere Studien Anhaltspunkte liefern, welche beispielsweise gesteigerte Proliferation und Lipidtropfenbildung in Enterozyten nach Leptin-Gabe zeigen<sup>45</sup>. Auch könnte das „Creeping Fat“ als eine Barriere für die durch die gestörte Barrierefunktion der Mukosa erhöhte Mikroorganismentranslokation dienen und damit das Entzündungsgeschehen örtlich begrenzen<sup>43,46-49</sup>.

Neben der Induktion einer erhöhten TNF $\alpha$ -Expression in T-Zellen und Monozyten scheint die rLeptin-Gabe bei unserem Patienten noch weitere Effekte auf das Immunsystem gehabt zu haben, welche in Zusammenschau mit den Beobachtungen vor rLeptin-Substitution zusätzliche Rückschlüsse auf die Rolle von Leptin sowohl bei M. Crohn als auch in der physiologischen Homöostase des Immunsystems zulassen. So deuten beispielsweise die deutlich reduzierte Expression von Perforin in NK-Zellen, das veränderte CD56/CD16 Expressionsmuster und die generell sehr niedrigen relativen Zellzahlen von NK-Zellen vor rLeptin-Therapie auf eine wichtige Rolle von Fettgewebe und Adipokinen in der NK-Zellhomöostase hin. Leptin scheint hier zumindest teilweise involviert zu sein, da sich die Perforin-Expression unter rLeptin-Therapie stark steigert und sich das Expressionsmuster von CD56 ändert. Dies deckt sich mit *in vitro*-Beobachtungen aus anderen Studien, wonach murine NK-Zellen ohne Leptin-Rezeptor eine gestörte Differenzierung und Funktion aufweisen<sup>50</sup> und die Gabe von Leptin zu gesteigerter Proliferation, Zytotoxizität und Perforin-Expression in der humanen NK-Zelllinie YT führt<sup>51</sup>. Jedoch scheinen noch weitere Faktoren neben Leptin involviert zu sein, da auch nach rLeptin-Substitution die relative Anzahl der NK-Zellen nicht zunahm. Weiterhin stützen die vor rLeptin-Gabe reduzierte Häufigkeit von CD14<sup>+</sup> Monozyten sowie die Veränderung der Serumkonzentrationen einiger monozytärer Zytokine und vor allem die sehr starke Expansion von CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen unter der rLeptin-Therapie die Annahme, dass auch Zellen aus der monozytären Reihe dem Einfluss von Leptin und anderen fettgewebsassoziierten Faktoren unterliegen. Zusammenfassend lässt sich also schlussfolgern, dass Leptin in der Kontrolle von einer Vielzahl von Immunzellen eine Rolle zu spielen scheint.

Neben den Effekten auf Phänotyp und Funktion von Immunzellen scheint Leptin auch den Metabolismus von Immunzellen zu beeinflussen. Dies lässt sich zum einen aus den Ergebnissen der Seahorse-Analysen schlussfolgern, welche nahelegen, dass Leptin zu reduzierter Energiegewinnung über mitochondriale Atmung führt. Da Veränderungen des Immunzellmetabolismus eine Veränderung des Immunzellphänotyps vermitteln können<sup>33</sup>, auch als metabolische Reprogrammierung bezeichnet, könnte dies auch ein möglicher Mechanismus sein, über den Leptin seine Wirkung auf Immunzellen entfaltet. Dies wird gestützt durch frühere Beobachtungen unserer Gruppe, wonach Adipokine den Phänotyp von Makrophagen beeinflussen können<sup>52</sup>. Neben dem Einfluss auf den Energiestoffwechsel, gibt es in dieser Studie zudem auch Hinweise auf eine Rolle von Fettgewebe bzw. Leptin in anderen Stoffwechselwegen. Einerseits war im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle der Calcium-Einstrom in CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor rLeptin-Gabe verringert. Andererseits war in T- und NK-Zellen sowie in CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen unseres Patienten initial die Expression von CD38, einem multifunktionalen Enzym mit Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) Nukleosidase Aktivität<sup>53</sup>, erhöht und nahm unter Therapie mit rLeptin ab. Dabei konnte für humane CD4<sup>+</sup> T-

Zellen bereits gezeigt werden, dass CD38 eine Rolle in der Regulation von NAD<sup>+</sup>-Metabolismus, oxidativer Phosphorylierung und Glutaminolyse spielt<sup>54</sup>. Interessanterweise konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass CD38 auch in der Pathogenese von intestinaler Inflammation involviert ist, da *CD38*<sup>-/-</sup> Mäuse eine weniger stark ausgeprägte Dextran Natriumsulfat (DSS) Kolitis entwickelten<sup>55</sup>. Dazu passend war in unserer Studie in der Gruppe der M. Crohn Patienten die Expression von CD38 in CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T-Zellen und in CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Zellen im Vergleich mit den gesunden Kontrollen signifikant erhöht.

Trotz Bemühungen ist es uns nicht gelungen weitere Patienten mit AGLCD, etwa an anderen Zentren, zu identifizieren und damit die Aussagekraft unserer Studie zu erhöhen. Daher sind die Ergebnisse dieser Arbeit aufgrund der Einzigartigkeit dieses Patienten auf die Stichprobengröße von  $n = 1$  limitiert und können nur mit Vorsicht interpretiert werden. Weiterhin ist durch den beobachtenden Charakter der Studie die jeweilige Kausalität der nach rLeptin-Gabe gesehenen Effekte nicht zu beweisen und es ist außerdem nicht möglich direkte Effekte auf Immunzellen von möglichen sekundären oder tertiären Effekten auseinander zu halten. Auch muss erwähnt werden, dass die Immunsuppression, die der Patient aufgrund der Lebertransplantation erhielt, einen Einfluss auf die Immunzellen gehabt haben wird. Jedoch war die Medikation während der gesamten Studie gleich und wir werten das klinische Bild und die verstärkte Entzündungsaktivität, die sogar trotz dieser Immunsuppression auftrat, als Zeichen, dass der Einfluss der Immunsuppression auf das Gesamtbild der erworbenen Erkenntnisse als eher gering einzuschätzen ist. Außerdem sind die Erkenntnisse der Studie aufgrund der eingeschränkten Indikation für rLeptin und der Seltenheit von Lipodystrophie oder vergleichbaren Erkrankungen in Kombination mit M. Crohn auf andere Weise nur sehr schwer bis gar nicht *in vivo* im Menschen zu gewinnen. Ebenso ist zu betonen, dass für „Creeping Fat“ kein repräsentatives Tiermodell existiert<sup>8</sup>. Deshalb glauben wir, dass die Studie trotz dieser Limitationen wertvolle neue Erkenntnisse zu der Rolle von Fettgewebe und Leptin bei intestinaler Entzündung im Menschen liefert, insbesondere dort wo die Ergebnisse von Beobachtungen aus anderen Studien im Tiermodell bzw. *in vitro* gestützt werden. Auch liefert unsere Arbeit im Sinne einer hypothesengenerierenden Studie somit Anhaltspunkte für künftige Studien. Um die Aussagekraft unserer Beobachtungen zu steigern und um die Übertragbarkeit auf andere inflammatorische Erkrankungen zu überprüfen, versucht unsere Arbeitsgruppe deshalb als nächsten Schritt Patienten mit Lipodystrophie und einer anderen entzündlichen Komorbidität für eine mögliche weiterführende Studie zu finden.

Die beobachteten Unterschiede in der Häufigkeit bestimmter Immunzellen im peripheren Blut und in der Markerexpression zwischen Patienten mit M. Crohn und gesunden Kontrollen weisen auf einen speziellen Immunphänotyp beim M. Crohn hin. Dieser spezielle Immunphänotyp bedarf noch weiterer Untersuchungen, um die jeweilige pathophysiologische Relevanz, Abgrenzung zum Phänotyp bei anderen inflammatorischen Erkrankungen und

dadurch möglicherweise auch neue therapeutische oder diagnostische Ansätze besser einzuordnen. Denkbar wären hier, falls sich der Immunphänotyp in zukünftigen Studien auch gegenüber dem von Colitis ulcerosa und anderen inflammatorischen Erkrankungen abgrenzen ließe, z.B. neue labortechnische Verfahren zur Diagnose eines M. Crohn.

Da bei erworbener generalisierter Lipodystrophie in einem Viertel der Fälle eine autoimmune Komorbidität auftritt<sup>21</sup>, ist es abschließend denkbar, dass es noch weitere Fälle gibt, in denen unter einer rLeptin-Therapie eine Verschlechterung einer inflammatorischen Krankheit eintritt. Die Induktion von TNF $\alpha$  durch rLeptin und das Ansprechen des M. Crohn des AGLCD Patienten auf die TNF $\alpha$ -Antikörper Therapie mit Adalimumab deuten daher daraufhin, dass in solchen Fällen TNF $\alpha$ -Antikörper nach individueller Abwägung eine Therapieoption darstellen könnten.

### 1.5. Literaturverzeichnis

- 1 Ziegler, J. F., Böttcher, C., Letizia, M., Yerinde, C., Wu, H., Freise, I., Rodriguez-Sillke, Y., Stoyanova, A. K., Kreis, M. E., Asbach, P., Kunkel, D., Priller, J., Anagnostopoulos, I., Kühl, A. A., Miehle, K., Stumvoll, M., Tran, F., Fredrich, B., Forster, M., Franke, A., Bojarski, C., Glauben, R., Löscher, B. S., Siegmund, B. & Weidinger, C. Leptin induces TNF $\alpha$ -dependent inflammation in acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn's disease. *Nat Commun* **10**, 5629, doi:10.1038/s41467-019-13559-7 (2019).
- 2 Preiss, J. C., Bokemeyer, B., Buhr, H. J., Dignass, A., Hauser, W., Hartmann, F., Herrlinger, K. R., Kaltz, B., Kienle, P., Kruis, W., Kucharzik, T., Langhorst, J., Schreiber, S., Siegmund, B., Stallmach, A., Stange, E. F., Stein, J., Hoffmann, J. C. & German Society of, G. Aktualisierte S3-Leitlinie – „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ 2014. *Z Gastroenterol* **52**, 1431-1484, doi:10.1055/s-0034-1385199 (2014).
- 3 Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W. & Kaplan, G. G. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46-54 e42; quiz e30, doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001 (2012).
- 4 Crohn, B. B., Ginzburg, L. & Oppenheimer, G. D. Regional Ileitis: A Pathologic and Clinical Entity. *Journal of the American Medical Association* **99**, 1323-1329, doi:10.1001/jama.1932.02740680019005 (1932).
- 5 Friedman, S. & Blumberg, R. S. Inflammatory Bowel Disease. In: Anthony S. Fauci Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo., editors. *Harrison's principles of internal medicine, 19th edition, 1947–1965* (McGraw Hill Education Medical, New York, 2015).
- 6 Sheehan, A. L., Warren, B. F., Gear, M. W. & Shepherd, N. A. Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *Br J Surg* **79**, 955-958 (1992).
- 7 Kredel, L., Batra, A. & Siegmund, B. Role of fat and adipokines in intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* **30**, 559-565, doi:10.1097/MOG.000000000000116 (2014).
- 8 Kredel, L. I. & Siegmund, B. Adipose-tissue and intestinal inflammation - visceral obesity and creeping fat. *Front Immunol* **5**, 462, doi:10.3389/fimmu.2014.00462 (2014).
- 9 Paul, G., Schaffler, A., Neumeier, M., Furst, A., Bataille, F., Buechler, C., Muller-Ladner, U., Scholmerich, J., Rogler, G. & Herfarth, H. Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 471-477, doi:10.1097/00054725-200606000-00005 (2006).
- 10 Singh, U. P., Singh, N. P., Guan, H., Busbee, B., Price, R. L., Taub, D. D., Mishra, M. K., Fayad, R., Nagarkatti, M. & Nagarkatti, P. S. Leptin antagonist ameliorates chronic

- colitis in IL-10(-)/(-) mice. *Immunobiology* **218**, 1439-1451, doi:10.1016/j.imbio.2013.04.020 (2013).
- 11 Siegmund, B., Lehr, H. A. & Fantuzzi, G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* **122**, 2011-2025 (2002).
- 12 Siegmund, B., Sennello, J. A., Jones-Carson, J., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H. A., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M. & Fantuzzi, G. Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* **53**, 965-972 (2004).
- 13 Nishihara, T., Matsuda, M., Araki, H., Oshima, K., Kihara, S., Funahashi, T. & Shimomura, I. Effect of adiponectin on murine colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* **131**, 853-861, doi:10.1053/j.gastro.2006.06.015 (2006).
- 14 Obeid, S., Wankell, M., Charrez, B., Sternberg, J., Kreuter, R., Esmaili, S., Ramezani-Moghadam, M., Devine, C., Read, S., Bhathal, P., Lopata, A., Ahlensteil, G., Qiao, L., George, J. & Hebbard, L. Adiponectin confers protection from acute colitis and restricts a B cell immune response. *J Biol Chem* **292**, 6569-6582, doi:10.1074/jbc.M115.712646 (2017).
- 15 Sideri, A., Stavrakis, D., Bowe, C., Shih, D. Q., Fleshner, P., Arsenescu, V., Arsenescu, R., Turner, J. R., Pothoulakis, C. & Karagiannides, I. Effects of obesity on severity of colitis and cytokine expression in mouse mesenteric fat. Potential role of adiponectin receptor 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**, G591-604, doi:10.1152/ajpgi.00269.2014 (2015).
- 16 Fayad, R., Pini, M., Sennello, J. A., Cabay, R. J., Chan, L., Xu, A. & Fantuzzi, G. Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation. *Gastroenterology* **132**, 601-614, doi:10.1053/j.gastro.2006.11.026 (2007).
- 17 Peng, Y. J., Shen, T. L., Chen, Y. S., Mersmann, H. J., Liu, B. H. & Ding, S. T. Adiponectin and adiponectin receptor 1 overexpression enhance inflammatory bowel disease. *J Biomed Sci* **25**, 24, doi:10.1186/s12929-018-0419-3 (2018).
- 18 Oral, E. A., Simha, V., Ruiz, E., Andewelt, A., Premkumar, A., Snell, P., Wagner, A. J., DePaoli, A. M., Reitman, M. L., Taylor, S. I., Gorden, P. & Garg, A. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* **346**, 570-578, doi:10.1056/NEJMoa012437 (2002).
- 19 Farooqi, I. S., Jebb, S. A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C. H., Prentice, A. M., Hughes, I. A., McCamish, M. A. & O'Rahilly, S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* **341**, 879-884, doi:10.1056/NEJM199909163411204 (1999).
- 20 Garg, A. Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 3313-3325, doi:10.1210/jc.2011-1159 (2011).
- 21 Misra, A. & Garg, A. Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **82**, 129-146 (2003).
- 22 Bandura, D. R., Baranov, V. I., Ornatsky, O. I., Antonov, A., Kinach, R., Lou, X., Pavlov, S., Vorobiev, S., Dick, J. E. & Tanner, S. D. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **81**, 6813-6822, doi:10.1021/ac901049w (2009).
- 23 Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneebouer, M. A. M., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., Fidzinski, P., Kraus, L., Snijders, G. J. L., Kahn, R. S., Schulz, A. R., Mei, H. E., Psy, N. B. B., Hol, E. M., Siegmund, B., Glauben, R., Spruth, E. J., de Witte, L. D. & Priller, J. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci* **22**, 78-90, doi:10.1038/s41593-018-0290-2 (2019).
- 24 Amir el, A. D., Davis, K. L., Tadmor, M. D., Simonds, E. F., Levine, J. H., Bendall, S. C., Shenfeld, D. K., Krishnaswamy, S., Nolan, G. P. & Pe'er, D. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* **31**, 545-552, doi:10.1038/nbt.2594 (2013).
- 25 McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **120**, 5 1 1-5 1 11, doi:10.1002/cpim.40 (2018).

- 26 Hornbeck, P. V. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol* **110**, 2  
1 1-2 1 23, doi:10.1002/0471142735.im0201s110 (2015).
- 27 Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol  
Cell Biol* **20**, 137-155, doi:10.1038/s41580-018-0085-z (2019).
- 28 Listenberger, L. L. & Brown, D. A. Fluorescent detection of lipid droplets and associated  
proteins. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 24**, Unit 24 22,  
doi:10.1002/0471143030.cb2402s35 (2007).
- 29 Palmer, C. S., Anzinger, J. J., Butterfield, T. R., McCune, J. M. & Crowe, S. M. A Simple  
Flow Cytometric Method to Measure Glucose Uptake and Glucose Transporter  
Expression for Monocyte Subpopulations in Whole Blood. *J Vis Exp*,  
doi:10.3791/54255 (2016).
- 30 Feske, S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*  
**7**, 690-702, doi:10.1038/nri2152 (2007).
- 31 Desvignes, L., Weidinger, C., Shaw, P., Vaeth, M., Ribierre, T., Liu, M., Fergus, T.,  
Kozhaya, L., McVoy, L., Unutmaz, D., Ernst, J. D. & Feske, S. STIM1 controls T cell-  
mediated immune regulation and inflammation in chronic infection. *J Clin Invest* **125**,  
2347-2362, doi:10.1172/JCI80273 (2015).
- 32 Kellar, K. L., Kalwar, R. R., Dubois, K. A., Crouse, D., Chafin, W. D. & Kane, B. E.  
Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human  
cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry* **45**, 27-36, doi:10.1002/1097-  
0320(20010901)45:1<27::aid-cyto1141>3.0.co;2-i (2001).
- 33 Ghesquiere, B., Wong, B. W., Kuchnio, A. & Carmeliet, P. Metabolism of stromal and  
immune cells in health and disease. *Nature* **511**, 167-176, doi:10.1038/nature13312  
(2014).
- 34 Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S.,  
Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S. & Ferrick, D. A. Multiparameter metabolic  
analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function  
and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*  
**292**, C125-136, doi:10.1152/ajpcell.00247.2006 (2007).
- 35 Liang, C. C., Park, A. Y. & Guan, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and  
inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2**, 329-333,  
doi:10.1038/nprot.2007.30 (2007).
- 36 Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C. J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., Bode, H.,  
Epple, H. J., Riecken, E. O. & Schulzke, J. D. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)  
regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* **112**  
( Pt 1), 137-146 (1999).
- 37 Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler  
transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324 (2009).
- 38 Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G.,  
Abecasis, G., Durbin, R. & Genome Project Data Processing, S. The Sequence  
Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079,  
doi:10.1093/bioinformatics/btp352 (2009).
- 39 McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A.,  
Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M. & DePristo, M. A. The Genome  
Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA  
sequencing data. *Genome Res* **20**, 1297-1303, doi:10.1101/gr.107524.110 (2010).
- 40 Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna,  
V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R. I., DePaoli, A. M. & O'Rahilly, S.  
Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and  
neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin  
Invest* **110**, 1093-1103, doi:10.1172/JCI15693 (2002).
- 41 Oral, E. A., Javor, E. D., Ding, L., Uzel, G., Cochran, E. K., Young, J. R., DePaoli, A.  
M., Holland, S. M. & Gorden, P. Leptin replacement therapy modulates circulating  
lymphocyte subsets and cytokine responsiveness in severe lipodystrophy. *J Clin  
Endocrinol Metab* **91**, 621-628, doi:10.1210/jc.2005-1220 (2006).

- 42 Javor, E. D., Moran, S. A., Young, J. R., Cochran, E. K., DePaoli, A. M., Oral, E. A., Turman, M. A., Blackett, P. R., Savage, D. B., O'Rahilly, S., Balow, J. E. & Gordon, P. Proteinuric nephropathy in acquired and congenital generalized lipodystrophy: baseline characteristics and course during recombinant leptin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3199-3207, doi:10.1210/jc.2003-032140 (2004).
- 43 Weidinger, C., Ziegler, J. F., Letizia, M., Schmidt, F. & Siegmund, B. Adipokines and Their Role in Intestinal Inflammation. *Front Immunol* **9**, 1974, doi:10.3389/fimmu.2018.01974 (2018).
- 44 Wu, H., Weidinger, C., Schmidt, F., Keye, J., Friedrich, M., Yerinde, C., Willimsky, G., Qin, Z., Siegmund, B. & Glauben, R. Oleate but not stearate induces the regulatory phenotype of myeloid suppressor cells. *Sci Rep* **7**, 7498, doi:10.1038/s41598-017-07685-9 (2017).
- 45 Fazolini, N. P., Cruz, A. L., Werneck, M. B., Viola, J. P., Maya-Monteiro, C. M. & Bozza, P. T. Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell Cycle* **14**, 2667-2676, doi:10.1080/15384101.2015.1041684 (2015).
- 46 Siegmund, B. Mesenteric fat in Crohn's disease: the hot spot of inflammation? *Gut* **61**, 3-5, doi:10.1136/gutjnl-2011-301354 (2012).
- 47 Batra, A., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fischer, A., Glauben, R., Kunkel, D., Scheffold, A., Erben, U., Kuhl, A., Loddenkemper, C., Lehr, H. A., Schumann, M., Schulzke, J. D., Zeitz, M. & Siegmund, B. Mesenteric fat - control site for bacterial translocation in colitis? *Mucosal Immunol* **5**, 580-591, doi:10.1038/mi.2012.33 (2012).
- 48 Peyrin-Biroulet, L., Gonzalez, F., Dubuquoy, L., Rousseaux, C., Dubuquoy, C., Decourcelle, C., Saudemont, A., Tachon, M., Beclin, E., Odou, M. F., Neut, C., Colombel, J. F. & Desreumaux, P. Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut* **61**, 78-85, doi:10.1136/gutjnl-2011-300370 (2012).
- 49 Zulian, A., Cancellato, R., Micheletto, G., Gentilini, D., Gilardini, L., Danelli, P. & Invitti, C. Visceral adipocytes: old actors in obesity and new protagonists in Crohn's disease? *Gut* **61**, 86-94, doi:10.1136/gutjnl-2011-300391 (2012).
- 50 Tian, Z., Sun, R., Wei, H. & Gao, B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 297-302 (2002).
- 51 Zhao, Y., Sun, R., You, L., Gao, C. & Tian, Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 247-252, doi:10.1016/s0006-291x(02)02838-3 (2003).
- 52 Kredel, L. I., Batra, A., Stroh, T., Kuhl, A. A., Zeitz, M., Erben, U. & Siegmund, B. Adipokines from local fat cells shape the macrophage compartment of the creeping fat in Crohn's disease. *Gut* **62**, 852-862, doi:10.1136/gutjnl-2011-301424 (2013).
- 53 Chini, E. N. CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Curr Pharm Des* **15**, 57-63, doi:10.2174/138161209787185788 (2009).
- 54 Chatterjee, S., Daenthanasamak, A., Chakraborty, P., Wyatt, M. W., Dhar, P., Selvam, S. P., Fu, J., Zhang, J., Nguyen, H., Kang, I., Toth, K., Al-Homrani, M., Husain, M., Beeson, G., Ball, L., Helke, K., Husain, S., Garrett-Mayer, E., Hardiman, G., Mehrotra, M., Nishimura, M. I., Beeson, C. C., Bupp, M. G., Wu, J., Ogretmen, B., Paulos, C. M., Rathmell, J., Yu, X. Z. & Mehrotra, S. CD38-NAD(+) Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab* **27**, 85-100 e108, doi:10.1016/j.cmet.2017.10.006 (2018).
- 55 Schneider, M., Schumacher, V., Lischke, T., Lucke, K., Meyer-Schwesinger, C., Velden, J., Koch-Nolte, F. & Mittrucker, H. W. CD38 is expressed on inflammatory cells of the intestine and promotes intestinal inflammation. *PLoS One* **10**, e0126007, doi:10.1371/journal.pone.0126007 (2015).



## 2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jörn Felix Ziegler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von mesenterialem Fettgewebe und Leptin in der Pathophysiologie des Morbus Crohn“ („The Role of Mesenteric Adipose Tissue and Leptin in the Pathophysiology of Crohn’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](http://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

### **3. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen des Promotionsverfahrens zum Dr. med. bei geteilter Erstautorenschaft**

Publikation 1: Ziegler, J. F.\*, Böttcher, C.\*, Letizia, M., Yerinde, C., Wu, H., Freise, I., Rodriguez-Sillke, Y., Stoyanova, A. K., Kreis, M. E., Asbach, P., Kunkel, D., Priller, J., Anagnostopoulos, I., Köhl, A. A., Miehle, K., Stumvoll, M., Tran, F., Fredrich, B., Forster, M., Franke, A., Bojarski, C., Glauben, R., Löscher, B. S., Siegmund, B.<sup>+</sup> & Weidinger, C.<sup>+</sup> Leptin Induces TNF $\alpha$ -Dependent Inflammation in Acquired Generalized Lipodystrophy and Combined Crohn's Disease. *Nature Communications* 10, 5629, doi:10.1038/s41467-019-13559-7 (2019).

\* Geteilte Erstautorenschaft; \* Geteilte Letztautorenschaft

#### Eigener Beitrag im Einzelnen:

Alle in der Publikation veröffentlichte Experimente und Untersuchungen wurden von mir eigenverantwortlich oder in Zusammenarbeit mit den Betreuern konzipiert und geplant. Nach Aufklärung durch Studienärzte und Einwilligung in die Teilnahme habe ich für alle Experimente mit Zellen oder Serum aus peripherem Blut die Isolation der Zellen bzw. die Gewinnung des Serums aus den Blutproben selbstständig durchgeführt. Für die massenzytometrischen Untersuchungen (Abbildung (Abb.) 1e-l, Abb. 3c, f, g, Supplementäre (Suppl.) Abb. 1, Suppl. Abb. 2, Suppl. Abb. 6e) habe ich die Isolierung und initiale Fixierung der Zellen durchgeführt; Teile (Abb. 1f-l, Abb. 3c und g, Suppl. Abb. 6e) der statistischen Auswertung und der graphischen Darstellung der Endergebnisse sind in enger Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. rer. nat. C. Böttcher entstanden. Die Färbung, Messung und Auswertung der Primärdaten der massenzytometrischen Untersuchungen wurden von Frau PD Dr. rer. nat. C. Böttcher durchgeführt, ebenso wie die statistischen Auswertungen und graphischen Darstellungen der massenzytometrischen Daten, welche nicht der gemeinsamen Zusammenarbeit entstammen (siehe oben). Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse der ELISA (Abb. 1b, Abb. 3a) und Cytometric Bead Array (Abb. 3h) Untersuchungen erfolgte durch mich, wobei die Messung der Proben Co-Autoren vornahmen. Die Zusammenstellung und Darstellung klinischer Daten und Parameter des AGLCD Patienten (Abb. 1 c, d, Suppl. Note 1, Suppl. Tab. 1, Suppl. Abb. 5) wurde von mir in Zusammenarbeit mit dem Betreuer und Studienarzt, Dr. med. C. Weidinger, vorgenommen. Die gesamten durchflusszytometrisch gemessenen Experimente inkl. Verfahren wie Lipid Droplet Messung, Calcium-Einstrom und *ex vivo* Stimulation der Zellen zur Zytokin-Messung (Abb. 2 komplett, Abb. 3b, d, e, Abb. 4g-i, Suppl. Abb. 3, Suppl. Abb. 4, Suppl. Abb. 6a-d, Suppl. Abb. 9) wurden von mir selbstständig durchgeführt, gemessen und ausgewertet. Bei den Metabolismus-Experimenten mittels Seahorse Analyse (Abb. 3 i, j, Suppl. Abb. 7 und 8) wurde die

Differenzierung/Inkubation der Zellen vor Messung teils durch mich und teils durch Co-Autoren durchgeführt, die Messung und Analyse der Primärdaten erfolgte durch Co-Autoren, während graphische Darstellung und Statistik von mir durchgeführt wurden. Scratch Assay und Messungen zum transepithelialen elektrischen Widerstand (Abb. 3k-m) erfolgten inklusive der statistischen Auswertung und graphischen Darstellung durch mich. Die histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen (Abb. 4b-e, Supp. Abb. 11) wurden durch Co-Autoren vom iPATH.Berlin durchgeführt, hier erfolgte lediglich die graphische Darstellung der Ergebnisse durch mich. Das Verfassen des Manuskripts der Publikation sowie die Erstellung der Abbildungen erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit den Betreuern Prof. B. Siegmund und Dr. med. C. Weidinger sowie mit der Co-Erstautorin PD Dr. rer. nat. C. Böttcher.

---

Unterschrift des Doktoranden

#### 4. Auszug Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“MULTIDISCIPLINARY SCIENCES”** Selected Category  
 Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 64 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	710,766	41.577	1.355810
2	SCIENCE	645,132	41.058	1.127160
3	Nature Communications	178,348	12.353	0.926560
4	Science Advances	10,194	11.511	0.057080
5	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	637,268	9.504	1.108220
6	National Science Review	952	9.408	0.004340
7	GigaScience	1,694	7.267	0.011030
8	Scientific Data	1,567	5.305	0.008550
9	Journal of Advanced Research	1,843	4.327	0.003820
10	Annals of the New York Academy of Sciences	46,160	4.277	0.033270
11	Science Bulletin	1,952	4.136	0.005900
12	Scientific Reports	192,841	4.122	0.718960
13	Journal of the Royal Society Interface	11,357	3.355	0.030960
14	Research Synthesis Methods	1,374	3.218	0.006030
15	PLoS One	582,877	2.766	1.862350
16	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A- MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	17,807	2.746	0.028220
17	Royal Society Open Science	2,145	2.504	0.009260
18	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A- MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	17,157	2.410	0.018270
19	PeerJ	7,377	2.118	0.031600
20	NPJ Microgravity	94	2.000	0.000350

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13559-7>

OPEN

# Leptin induces TNF $\alpha$ -dependent inflammation in acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn's disease

Jörn F. Ziegler<sup>1,2,13</sup>, Chotima Böttcher<sup>1,3,13</sup>, Marilena Letizia<sup>1,2</sup>, Cansu Yerinde<sup>1,2</sup>, Hao Wu<sup>1,2</sup>, Inka Freise<sup>1,2</sup>, Yasmina Rodriguez-Sillke<sup>1,2</sup>, Ani K. Stoyanova<sup>1,4</sup>, Martin E. Kreis<sup>1,4</sup>, Patrick Asbach<sup>1,5</sup>, Desiree Kunkel<sup>1,6</sup>, Josef Priller<sup>1,3,7</sup>, Ioannis Anagnostopoulos<sup>1,8</sup>, Anja A. Kühl<sup>1,9</sup>, Konstanze Miehle<sup>10</sup>, Michael Stumvoll<sup>10</sup>, Florian Tran<sup>11</sup>, Broder Fredrich<sup>11</sup>, Michael Forster<sup>11</sup>, Andre Franke<sup>11</sup>, Christian Bojarski<sup>1,2</sup>, Rainer Glauen<sup>1,2</sup>, Britta-Sabina Löscher<sup>11</sup>, Britta Siegmund<sup>1,2,13\*</sup> & Carl Weidinger<sup>1,2,12,13\*</sup>

Leptin has been shown to modulate intestinal inflammation in mice. However, clinical evidence regarding its immune-stimulatory potential in human Crohn's disease remains sparse. We here describe a patient with the unique combination of acquired generalized lipodystrophy and Crohn's disease (AGLCD) featuring a lack of adipose tissue, leptin deficiency and intestinal inflammation. Using mass and flow cytometry, immunohistochemistry and functional metabolic analyses, the AGLCD patient was compared to healthy individuals and Crohn's disease patients regarding immune cell composition, function and metabolism and the effects of recombinant *N*-methionylleptin (rLeptin) were evaluated. We provide evidence that rLeptin exerts diverse pro-inflammatory effects on immune cell differentiation and function, including the metabolic reprogramming of immune cells and the induction of TNF $\alpha$ , ultimately aggravating Crohn's disease in the AGLCD patient, which can be reversed by anti-TNF $\alpha$  therapy. Our results indicate that leptin is required for human immune homeostasis and contributes to autoimmunity in a TNF $\alpha$ -dependent manner.

<sup>1</sup>Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>2</sup>Department of Gastroenterology, Infectious Diseases and Rheumatology, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany. <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Psychiatry and Department of Neuropsychiatry, Berlin, Germany. <sup>4</sup>Department of Visceral Surgery, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany. <sup>5</sup>Department of Radiology, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany. <sup>6</sup>BIH Cytometry Core, Berlin Institute of Health, 10178 Berlin, Germany. <sup>7</sup>BIH Berlin, DZNE Berlin and University of Edinburgh and UK DRI, Edinburgh, UK. <sup>8</sup>Department of Pathology, Campus Charité Mitte, Berlin, Germany. <sup>9</sup>iPATH. Berlin-Immunopathology for Experimental Models, Core Facility of the Charité, Berlin, Germany. <sup>10</sup>Medical Department III-Endocrinology, Nephrology, Rheumatology, University of Leipzig Medical Center, Leipzig, Germany. <sup>11</sup>Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany. <sup>12</sup>Clinician Scientist Program, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>13</sup>These authors contributed equally: Jörn F. Ziegler, Chotima Böttcher, Britta Siegmund, Carl Weidinger. \*email: [britta.siegmund@charite.de](mailto:britta.siegmund@charite.de); [carl.weidinger@charite.de](mailto:carl.weidinger@charite.de)

The adipokine leptin regulates the differentiation, function and metabolism of a variety of immune cell subpopulations, as well as of intestinal epithelial cells<sup>1–3</sup>. Likewise, leptin has been implicated in the pathogenesis of intestinal inflammation in Crohn's disease (CD), in which hyperplastic mesenteric fat ("creeping fat") wraps inflamed small intestinal segments<sup>4</sup>, and acts as a source of leptin and additional adipokines, that can modulate both systemic immune cell composition, as well as intestinal epithelial cell function in animal models of colitis<sup>5</sup>. Previous studies have demonstrated that leptin deficiency as well as the pharmacologic blockade of the leptin receptor attenuate disease severity in mouse models of colitis<sup>6,7</sup>, highlighting a potential role for leptin in inflammatory bowel diseases. Accordingly, leptin was shown to induce the proliferation and polarization of CD4<sup>+</sup> T helper (Th) cells in animal models of autoimmune diseases<sup>8–11</sup>, whereas it suppresses the development and maintenance of regulatory CD4<sup>+</sup> T cells<sup>12</sup>. Furthermore, rectal application of leptin promotes intestinal inflammation in mice by activation of the NF- $\kappa$ B pathway in epithelial cells, suggesting that direct effects of leptin on the epithelium might contribute to the induction of inflammation in CD as well<sup>13</sup>.

It recently became evident that the function and metabolism of immune cells are closely interconnected. Increased glucose metabolism is required for effector functions such as cytokine production in pro-inflammatory M<sub>1</sub>-like macrophages and T cells, whereas regulatory T cells and immune-suppressive M<sub>2</sub>-like macrophages highly depend on lipid oxidation-based metabolism<sup>14</sup>. Interestingly, leptin has recently been shown to orchestrate immune cell metabolism and function as it facilitates anaerobic glycolysis in murine Th17 cells resulting in increased production of IL-17 and neuronal inflammation in the model of experimental autoimmune encephalomyelitis, emphasizing a critical role for leptin at the crosslink of metabolism and function of immune cells<sup>15</sup>.

However, human data on the immune modulatory effects of leptin are limited to extremely rare diseases including (i) congenital leptin deficiency where T cell hypo-responsiveness, as well as metabolic dysfunction have been shown to be reversible by leptin substitution<sup>16</sup>, and (ii) acquired generalized lipodystrophy<sup>17</sup>, a condition with approximately 100 known cases worldwide<sup>18</sup>. Lipodystrophy patients suffer from a varying degree of adipocyte loss, resulting in hypo-leptinemia, severe insulin resistance, fatty liver and muscular degeneration. Acquired lipodystrophy can manifest at different ages and loss of adipose tissue can be complete and has been associated with autoimmunity<sup>19</sup>. To our knowledge, no other case of acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn's disease (AGLCD) has previously been reported. Since the formation of the aforementioned creeping fat is restricted to small intestinal CD and cannot be observed in mouse models<sup>20</sup>, little is known about the effects of creeping fat-derived leptin on immune cell differentiation and disease activity in CD.

Here, we describe a 21-year-old Caucasian male with AGLCD who received daily injections with 2.5 mg recombinant *N*-methionylleptin (rLeptin). Deep immune profiling by mass and flow cytometry and ex vivo functional assays in addition to clinical assessment before and after rLeptin substitution revealed distinct pro-inflammatory effects of rLeptin treatment that result in an aggravation of intestinal inflammation in a TNF $\alpha$ -dependent manner.

## Results

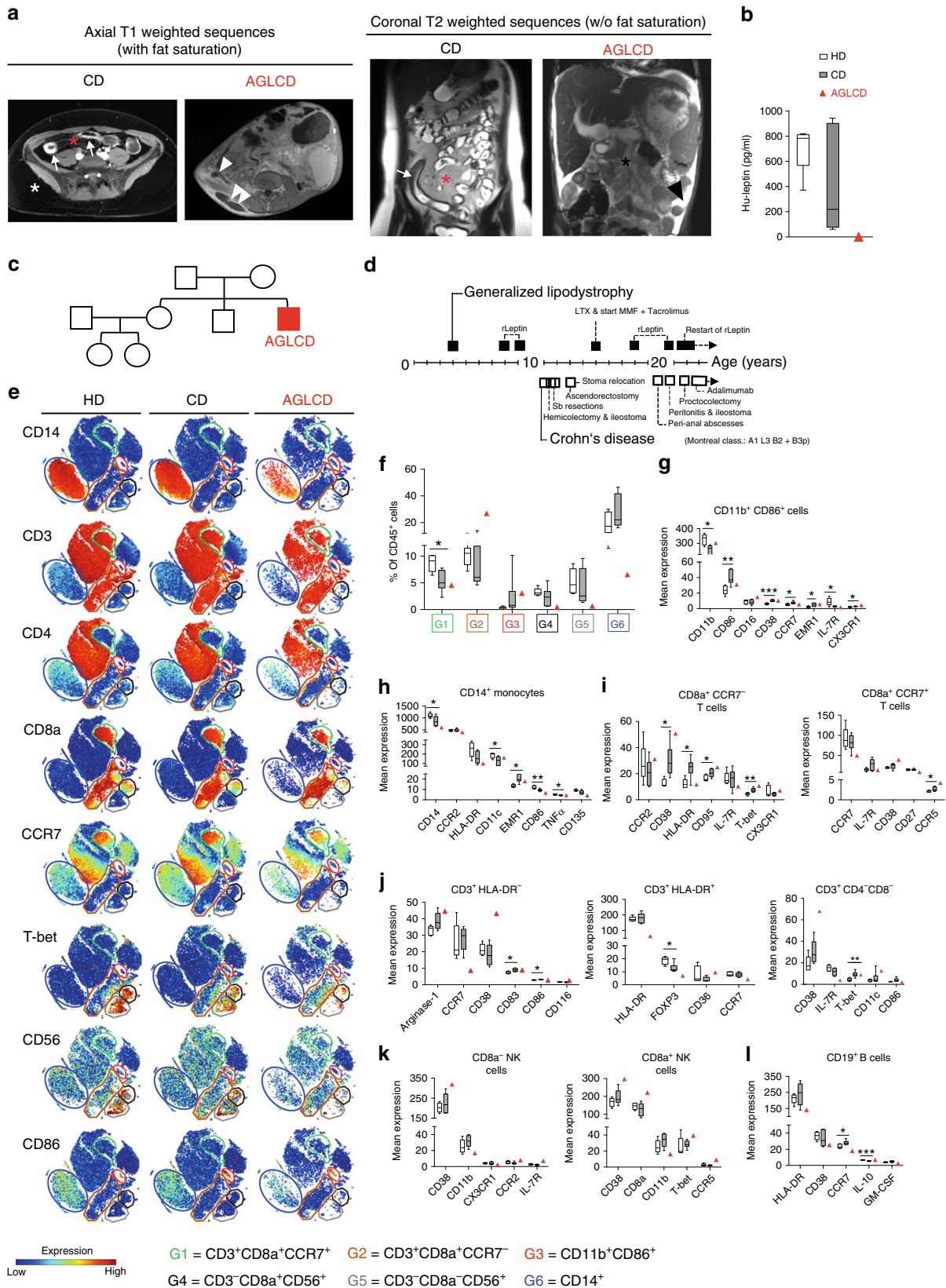
**Clinical phenotype of the AGLCD patient.** To date, it remains elusive how mesenteric fat and fat-derived leptin shape systemic inflammation in CD and very few clinical scenarios exist, in which the administration of recombinant adipokines is justified

and in which their immune modulatory function can be studied in human pathophysiology. The AGLCD patient featured a complete lack of visceral and subcutaneous adipose tissue (Fig. 1a), absent leptin production (Fig. 1b), and severe intestinal inflammation (see Supplementary Note 1 and Supplementary Table 1 for a detailed case report and a summary of autoimmune serum markers of the AGLCD patient). Of note, none of the patient's relatives displayed similar symptoms (Fig. 1c) and no causative mutation could be detected in genes commonly associated with generalized lipodystrophy by exome sequencing (data not shown). The AGLCD patient had initially developed acquired generalized lipodystrophy at the age of 4 years and had been diagnosed with CD (Montreal Classification A1 L3 B2 + B3p) at the age of 11 years, thus suffering from an aggressive variant of CD. As a consequence of generalized lipodystrophy, the AGLCD patient had subsequently developed fatty liver degeneration requiring liver transplantation at the age of 15 years. Figure 1d summarizes the clinical history of the AGLCD patient and compiles lipodystrophy-related and Crohn's-related interventions and complications.

**Altered immune cell composition in the AGLCD patient.** In order to characterize how the absence of fat tissue affects systemic immune cell composition in the AGLCD patient and to obtain a baseline of his immunologic makeup, we first compared peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the AGLCD patient with lymphocytes of healthy donors (HD) and patients with CD using mass cytometry for a high dimensional immune cell analysis which allowed us to better discriminate between lipodystrophy-associated and CD-specific immune cell alterations. Similar to our previously published protocol<sup>21</sup>, antibodies against lineage markers for T cells (CD3, CD4, CD8), monocytic cells (CD11b, CD11c, CD14, EMR1), B cells (CD19) and NK cells (CD16, CD56), as well as antibodies against functional markers (CD36, CD163, TREM2, arginase1, CD206), differentiation markers (CD33, CD40, CD45, CD64, CD95, CD115, CD116, CD135), homing markers (CD54, CD68, CD103, CCR2, CCR5, CCR7, CXCR3, MCP-1), activation markers (CD62L, CD83, CD86, CD124, CD135, HLA-DR, IL-7R), transcription factors (Tbet, FOXP3), cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF) and metabolic markers (CD27, CD38, PD-1, PD-1 L, ADRP) served for a deep immune profiling of PBMCs (Supplementary Table 2).

We performed an unsupervised high-dimensional data analysis of CD45<sup>+</sup> cells using the t-distributed stochastic linear embedding (t-SNE) algorithm (Fig. 1e) and compared the frequency of cell subsets according to their expression levels of classical cell lineage markers, such as CD11b, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, and CD56, as well as functional, homing and activation markers, including CD86, CCR7, and HLA-DR (Fig. 1e, f). The expression levels of all markers in the different subpopulations were subsequently compared between healthy donors, CD patients and the AGLCD patient (Fig. 1g–l). To validate the degree of reproducibility of our mass cytometric data and to control for possible batch effects, we compared the expression of 16 overlapping immune markers included in both our mass cytometry antibody panels, revealing a high correlation between the two antibody panels, thus confirming the reliability of our findings (Supplementary Figs. 1 and 2).

In analogy to CD patients, we observed a reduced frequency of CD8a<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (G1) T cells, as well as an increase in CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (G3) cells in the AGLCD patient when compared to healthy controls, highlighting a pre-activation of monocytes under inflammatory conditions and thus reflecting CD-induced changes in immune cell composition (Fig. 1e, f), which were further reflected



by comparable expression patterns of several differentiation and functional markers on CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> cells and CD14<sup>+</sup> monocytes of CD patients and the AGLCD patient (Fig. 1g, h).

In contrast, we found a severe reduction of CD14<sup>+</sup> monocytes (G6) and of Tbet<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (G4) and Tbet<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>

NK cells (G5) in the AGLCD patient but not in CD patients or healthy donors (Fig. 1e, f), suggesting that these alterations are lipodystrophy-specific and at least partially caused by leptin deficiency as leptin receptor-deficient *db/db* mice also show decreased frequencies of NK cells<sup>22</sup>.

**Fig. 1** 21-year-old male presenting with AGLCD and consecutively altered immune phenotype. The AGLCD patient was compared to Crohn's disease patients (CD) and healthy donors (HD). **a** MRI scans in two different sequences of a CD patient and the AGLCD patient, showing the complete lack of subcutaneous and visceral adipose tissue in the AGLCD patient. The white star indicates subcutaneous fat in the CD patient, the red star depicts mesenteric fat ("creeping fat") with injections of blood vessels wrapping inflamed intestinal segments (comb sign), the white arrows mark inflamed lesions in the CD patient. The single white arrowhead indicates a fistula in the AGLCD patient, the two white arrowheads depict a subcutaneous abscess, the single black star highlights the absence of mesenteric fat in the AGLCD patient, the black arrowhead marks free abdominal fluid. **b** Leptin serum concentrations assessed by ELISA in the AGLCD patient, CD patients ( $n = 7$ ) and HD ( $n = 5$ ) in biologically independent samples. **c** Family tree of the AGLCD patient. **d** Graphical summary of the AGLCD patient's clinical history. **e-l** Comparative immune profiling of PBMCs of the AGLCD patient, CD patients ( $n = 6$ ) and HD ( $n = 5$ ) by mass cytometry in biologically independent samples. **e** two-dimensional projections of single cell data generated by t-SNE of PBMCs. Desired subpopulations were gated (G1-G6). Heat colors of expression levels of selected markers have been scaled for each marker individually, while red denotes high and blue low expression. **f** Boxplots show the frequencies of different cell subsets (G1-G6). **g-l** Boxplots show mean expression levels (arbitrary unit) of selected markers in each cell subset. Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. Whisker plots show the min (smallest) and max (largest) values. The line in the box denotes the median. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , two-tailed unpaired *t*-test without correction for multiple comparison. The source data are provided as a Source Data file.

In comparison to CD patients and healthy donors, we furthermore detected a high expression of the activation marker CD38 on CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>, T and NK cells in the AGLCD patient (Fig. 1g, i-k), which has previously been linked to the development of lipodystrophy in HIV patients receiving anti-retroviral therapy<sup>23</sup> and to intestinal inflammation in human and mice<sup>24</sup> as DSS-induced colitis is attenuated in CD38<sup>-/-</sup> mice<sup>25</sup>. Of note, CD38 was significantly upregulated in CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T cells of CD patients underlining a potential disease-propagating role of CD38 in CD.

Furthermore, the AGLCD patient featured a reduced expression of CCR7 in his T and B cell compartment (Fig. 1i, j, l), suggesting an additional disturbance of lymphocyte trafficking as CCR7 has been implicated in the homing of lymphocytes to adipose tissue<sup>26</sup>.

To functionally characterize the lymphocytes in the AGLCD patient, we stimulated PBMCs of the AGLCD patient, CD patients or healthy donors with ionomycin/PMA or LPS and determined TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  production by flow cytometry (Supplementary Table 3 and Supplementary Fig. 3). As shown in Fig. 2a, b, we observed that the frequencies and mean fluorescence intensity (MFI) levels of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T, NK cells and CD14<sup>+</sup> monocytes were similar in cells isolated from the AGLCD patient when compared to CD patients and healthy donors. Likewise, the frequency of FOXP3 expressing CD4<sup>+</sup> T cells was comparable in the AGLCD patient and healthy donors (Supplementary Fig. 4).

#### Impaired NK and T cell differentiation in the AGLCD patient.

Since we had found reduced frequencies of NK cells in the AGLCD patient (Fig. 1e, f) using mass cytometry, we further characterized his NK cell compartment by flow cytometry. Here, we found lower frequencies of NK cells expressing the cytotoxic molecules perforin and granzyme B, as well as a lower perforin expression in the AGLCD patient in comparison to healthy donors and CD patients. In contrast, CD patients displayed a significantly higher frequency of granzyme B<sup>+</sup> NK cells ( $p < 0.001$ ) and an increased expression level of granzyme B ( $p < 0.05$ ) when compared to healthy donors, whereas perforin expression was similar in both groups (Fig. 2c). In addition, we observed a disturbed pattern of CD56/CD16 expression in the AGLCD patient's NK cells compared to a healthy individual (Supplementary Fig. 4). These data indicate that the absence of fat tissue and therefore fat tissue-derived adipokines results in phenotypic and functional alterations of NK cells.

As the absent storage capacity of fat in adipocytes leads to hypertriglyceridemia in lipodystrophy patients<sup>19</sup> and it has been shown that intracellular accumulation of lipid droplets impairs the killing capacity of cytotoxic NK cells by metabolic reprogramming with subsequent downregulation of granzyme

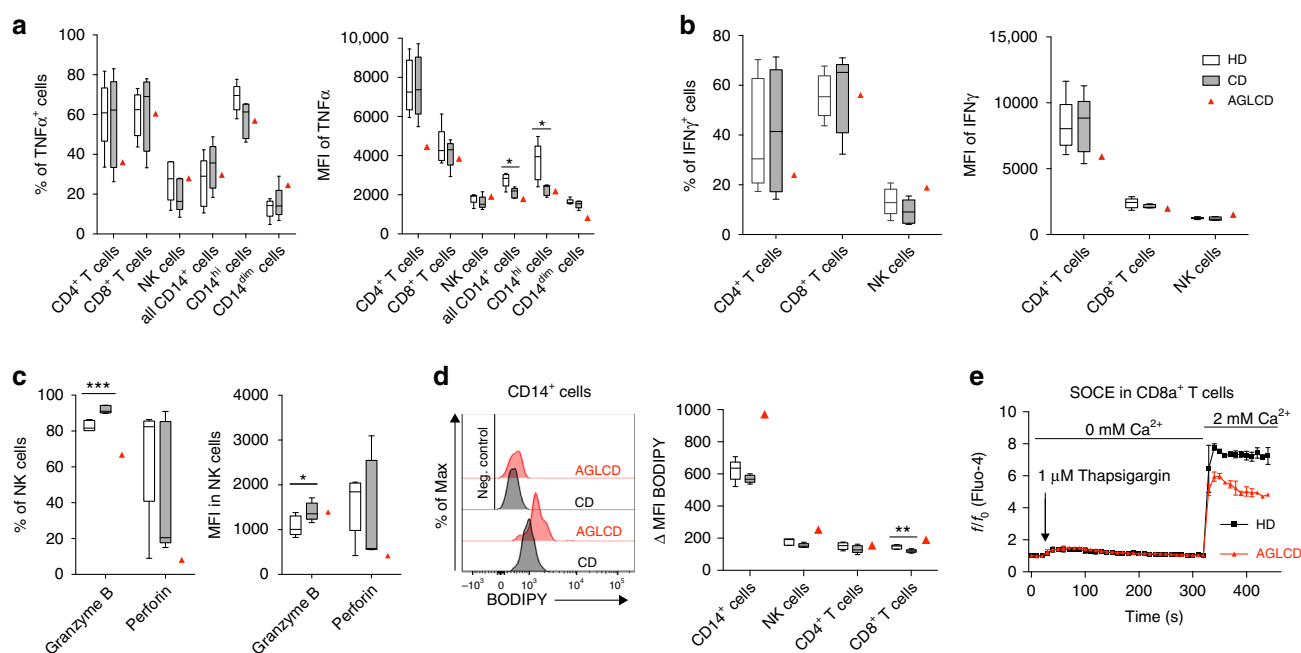
B<sup>27</sup>, we next measured the lipid droplet content in various immune cell subsets. As shown in Fig. 2d, the AGLCD patient displayed a higher deposition of lipid droplets in monocytes, NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells when compared to CD patients and healthy donors. Interestingly, Greineisen et al. have recently described that lipid droplet accumulation decreases the capacity of lymphocytes to flux calcium<sup>28</sup>, which is required to control the expansion of naive CD8<sup>+</sup> T cells by orchestrating metabolic programming and inducing glycolysis<sup>29</sup>. In line with increased lipid droplets accumulation, we found an impaired calcium homeostasis in CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 2e), suggesting that the deranged lipid metabolism in the AGLCD patient contributes to the observed functional and metabolic immune cell dysfunctions. Please note that due to the very low frequency of NK cells in the AGLCD patient no reliable calcium measurements or functional killing assays could be obtained for NK cells. Glucose uptake, however, was not altered in PBMCs of the AGLCD patient (Supplementary Fig. 4). The observed changes in immune cell metabolism in the AGLCD patient were further reflected by the increased expression of CD38 in T and NK cells, as CD38, a multifunctional enzyme with nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) nucleosidase activity<sup>30</sup>, is not only a marker for activated T cells<sup>31</sup>, but was also shown to regulate NAD<sup>+</sup> metabolism, oxidative phosphorylation and glutaminolysis in human CD4<sup>+</sup> T cells<sup>32</sup>.

#### rLeptin-induced TNF $\alpha$ production and immune cell alterations.

Since the AGLCD patient suffered from extreme insulin resistance due to lipodystrophy and consecutive leptin deficiency, we decided to restart rLeptin substitution, which had previously been initiated within the compassionate use program for rLeptin at the University of Leipzig but had been stopped by the patient months prior admission to our hospital due to non-compliance.

The patient received daily subcutaneous injections with 2.5 mg rLeptin. After 4 days of rLeptin administration, a substantial serum concentration of leptin could be detected in the AGLCD patient (Fig. 3a). Consequently, rLeptin substitution reduced the required insulin concentrations of the patient ~10-fold and decreased the amount of lipid droplets in T, NK, and monocytic cells (Fig. 3b), which was also indicated by a decreased expression of ADRP, a lipid droplet binding protein (Fig. 3c). In line with this reduction in intracellular lipid droplet formation, the serum levels of triglycerides and total cholesterol also dropped and normalized under treatment with rLeptin (Supplementary Fig. 5). Strikingly, rLeptin substitution led to an increased pro-inflammatory activity of distinct immune cells, as reflected by an upregulation of perforin expression in NK and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 3d), as well as an increased frequency and MFI of TNF $\alpha$ -expressing cells after ex vivo stimulation with ionomycin and





**Fig. 2** Functional and metabolic alterations of immune cells in the AGLCD patient. PBMCs of the AGLCD patient, Crohn's disease (CD) patients and healthy donors (HD) were compared by flow cytometry. **a–b** After ex vivo stimulation with PMA/ionomycin or LPS, the percentage of **(a)** TNF $\alpha$ -producing and **(b)** IFN $\gamma$ -producing T, NK and monocytic cells were determined, as well as the respective mean fluorescence intensity (MFI) serving as a measure of the amount of cytokine production (CD:  $n = 5$ , HD:  $n = 6$  for T and NK cells; CD:  $n = 5$ , HD:  $n = 5$  for CD14 $^+$  cells, biologically independent samples). **c** Unstimulated NK cells were analyzed for perforin and granzyme B expression regarding percentage of expressing cells and MFI (CD:  $n = 5$ , HD:  $n = 5$ , biologically independent samples). **d** Lipid droplet accumulation in immune cells was determined by BODIPY staining (CD:  $n = 5$ , HD:  $n = 5$ , biologically independent samples). **e** Store-operated Ca $^{2+}$  entry (SOCE) was measured in CD8 $^+$  T cells comparing AGLCD patient with HD ( $n = 1$ , both in technical duplicates). Boxes extend from the 25th to 75th percentiles. Whisker plots show the min (smallest) and max (largest) values. The line in the box denotes the median. Error bars on the SOCE plot represent the standard deviation (SD). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , two-tailed unpaired  $t$ -test without correction for multiple comparison. The source data are provided as a Source Data file.

PMA (Fig. 3e). In addition to these functional changes, we also detected an expansion of activated CD11b $^+$ CD86 $^+$  cells (G3) seven days after rLeptin application, whereas reduced numbers of CD8a $^+$ CCR7 $^-$  T cells (G2), CD19 $^+$  B cells and CD8a $^+$  NK cells (G4) were found after treatment with rLeptin (Fig. 3f, g).

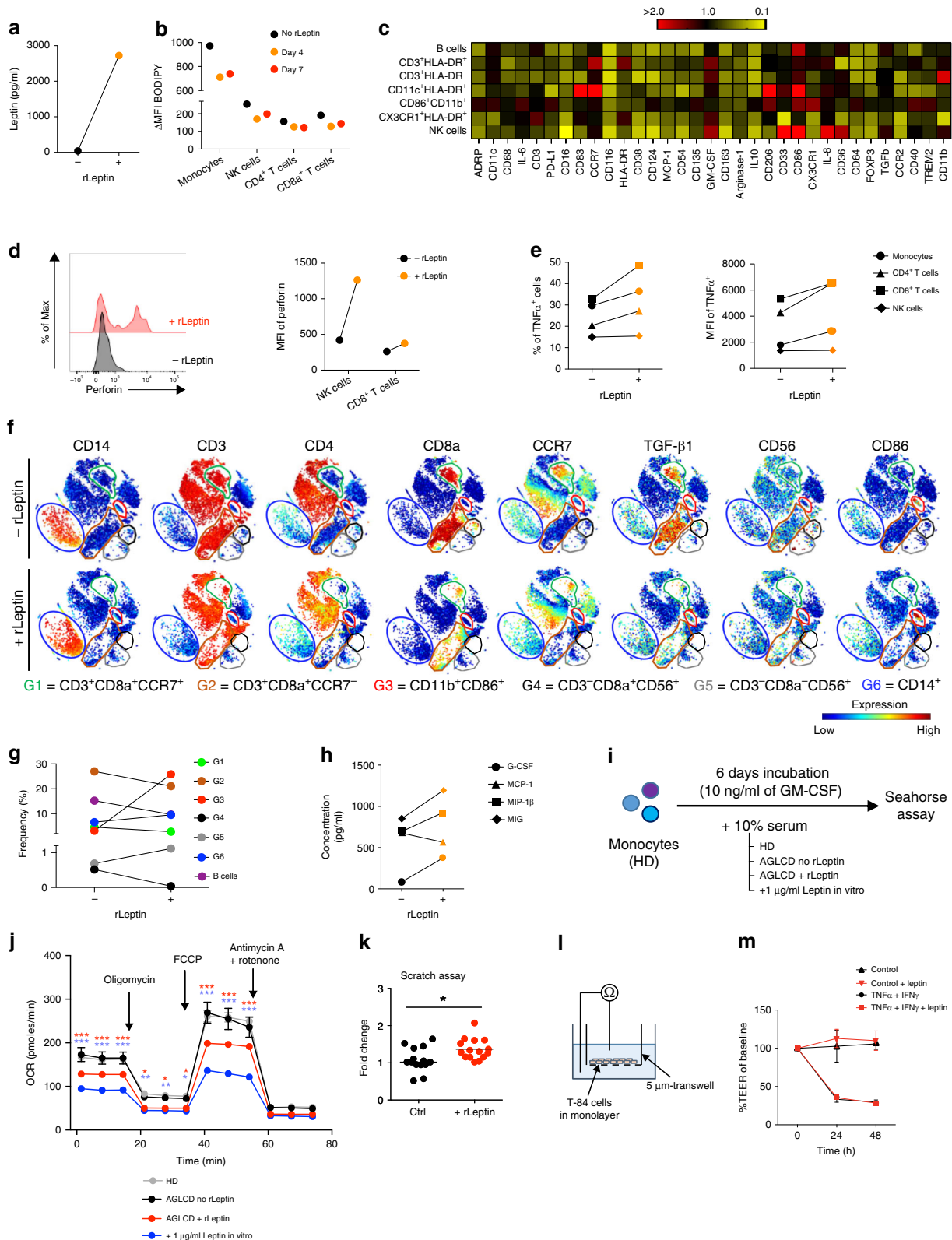
In our view, the observed phenotypic and functional changes of NK cells in response to rLeptin treatment, including a change in CD56 expression pattern (Supplementary Fig. 6), granzyme B and perforin expression, as well as cytokine production, demonstrate that leptin is an important regulator of NK cell differentiation and function. Accordingly, leptin receptor-deficient mice show impaired NK cell development and function<sup>22</sup>, whereas leptin administration increases the proliferation, cytotoxic capacity and perforin expression in the human NK cell line YT<sup>33</sup>. However, as indicated by the NK cell numbers remaining low even after rLeptin substitution, other fat tissue-derived factors such as adipokines and metabolites likely contribute to proper NK cell development and might be missing in the fat-deficient AGLCD patient.

Deep immune profiling of PBMCs by mass cytometry showed additional rLeptin-associated pro-inflammatory phenotypes in various immune cell subpopulations in the AGLCD patient (Fig. 3c and Supplementary Fig. 6). For example, in CD11b $^+$ CD86 $^+$ , T and NK cells, we found a reduced arginase-1 and increased CD86 expression following rLeptin treatment (Fig. 3c). Arginase-1 has been proposed as a marker for alternatively-activated macrophages<sup>34</sup> and is an important intrinsic regulator of amino acid metabolism and glycolysis in innate lymphoid cells type 2<sup>35</sup>. Furthermore, we observed decreased CD38 expression in T, NK and CD11b $^+$ CD86 $^+$  cells following rLeptin administration, which

supports the assumption of leptin-dependent regulations of NAD $^+$  metabolism in these cells with downstream effects on glutaminolysis and energy metabolism<sup>30,32</sup>. In addition, we found increased serum concentrations of several pro-inflammatory, monocyte-derived cytokines including G-CSF, MIG and MIP-1 $\beta$  upon rLeptin application (Fig. 3h), suggesting that rLeptin substitution results in increased activation of myeloid cells.

Metabolic reprogramming of immune cells by adipocytes and adipokines was shown to trigger specific differentiation programs, thereby determining their function<sup>36,37</sup>. Thus, pro-inflammatory macrophages highly depend on glycolysis for their energy homeostasis, whereas fatty acid oxidation is a feature of macrophages with anti-inflammatory properties<sup>38</sup>. Accordingly, when we differentiated monocyte-derived macrophages of a healthy donor in the presence of serum obtained from the AGLCD patient after rLeptin substitution, cells showed a reduced mitochondrial respiration when compared to macrophages that received AGLCD serum without rLeptin (Fig. 3i, j), whereas their extracellular acidification rates (ECAR) were comparable (Supplementary Fig. 7). Likewise, in vitro expanded CD8 $^+$  T cells featured an altered oxygen consumption and extracellular acidification rate after incubation with AGLCD serum substituted with rLeptin when compared to controls receiving serum of the AGLCD patient without rLeptin (Supplementary Figs. 8 and 9), suggesting that leptin directly influences the bioenergetics of immune cells.

Since intestinal epithelial cells express the leptin receptor<sup>39</sup> and direct effects of leptin on epithelial cells have been reported<sup>2</sup>, we wanted to investigate if leptin might influence epithelial barrier homeostasis in intestinal inflammation by looking at the wound



healing capacity and epithelial resistance of human intestinal epithelial cells in vitro. As shown in Fig. 3k leptin administration improved wound closure in vitro in scratch assays with T84 cells, without altering epithelial resistance (Fig. 3l, m).

**Intestinal inflammation under rLeptin substitution.** The high disease activity of CD observed in our AGLCD patient during rLeptin substitution and previously developed structural damage,

in particular fistula development, resulted in an abscess that ultimately led to ileocolonic resection and terminal ileostomy (Figs. 1d and 4a). Severe inflammation was detected in all resected intestinal segments (Fig. 4b). Results from immunohistochemistry (Supplementary Table 4) showed a massive infiltration of the intestinal mucosa with TNF $\alpha$ -expressing cells within the lamina propria of the AGLCD patient when compared to CD patients (Fig. 4c). In line with our mass cytometry data, we

**Fig. 3** Leptin induces pro-inflammatory immune responses in the AGLCD patient and improves wound healing in vitro. **a** Leptin serum concentrations of the AGLCD patient before (–) and after (+) 4 days of rLeptin substitution. **b–g** Flow and mass cytometric analysis of the effects of rLeptin treatment on PBMCs in the AGLCD patient after 4 and/or 7 days. **b** Lipid droplet content assessed by BODIPY staining. **c** Heat map displaying the relative changes in mean expression (compared to before rLeptin substitution) of various functional markers in different cell subsets (mass cytometry antibody panel B in Supplementary Table 2) (red, fold change above 2 (increased expression); yellow, fold change = 0.1 (decreased expression)). **d** Perforin expression measured as mean fluorescence intensity (MFI). **e** TNF $\alpha$ -expressing cells and the respective MFI. **f** Two-dimensional projections of single cell data generated by t-SNE of mass cytometry data (antibody panel A in Supplementary Table 2) show the effects on **(g)** frequencies of different cell subsets. Heat colors of expression levels of selected markers on t-SNE maps have been scaled for each marker individually (red, high expression; blue, low expression). **h** Serum levels of different immune cell-derived factors measured by CBA **i–j** Oxygen consumption rate (OCR) assessed by Seahorse analyses in monocyte-derived macrophages of a healthy donor differentiated in the presence of serum from the AGLCD patient before (“leptin-free”) and after in vitro or in vivo leptin/rLeptin substitution (performed in at least triplicates, error bars show  $\pm$  SEM, two-way ANOVA with post-tests and Holm-Sidak correction). The corresponding extracellular acidification rates (ECAR) are reported in Supplementary Fig. 7. **k** Scratch assay with human T84 intestinal epithelial cells in the presence of leptin to assess in vitro wound healing. **l–m** Effects of leptin on the transepithelial electrical resistance (TEER) across a monolayer of T84 cells after challenge with TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  to induce leakage (error bars show SD). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , two-tailed unpaired t-tests (where applicable). The source data are provided as a Source Data file.

furthermore observed a higher infiltration with activated CD86<sup>+</sup> cells in the AGLCD patient (Fig. 4d, e), indicating that the AGLCD patient had a TNF $\alpha$ -dependent inflammatory activity in his intestine at the time of surgery. Considering our data on the effects of rLeptin treatment on the AGLCD patient’s PBMCs (Fig. 3), we therefore hypothesized that rLeptin treatment induced a TNF $\alpha$ -driven pro-inflammatory immune response in the intestine, triggering a severe exacerbation of CD.

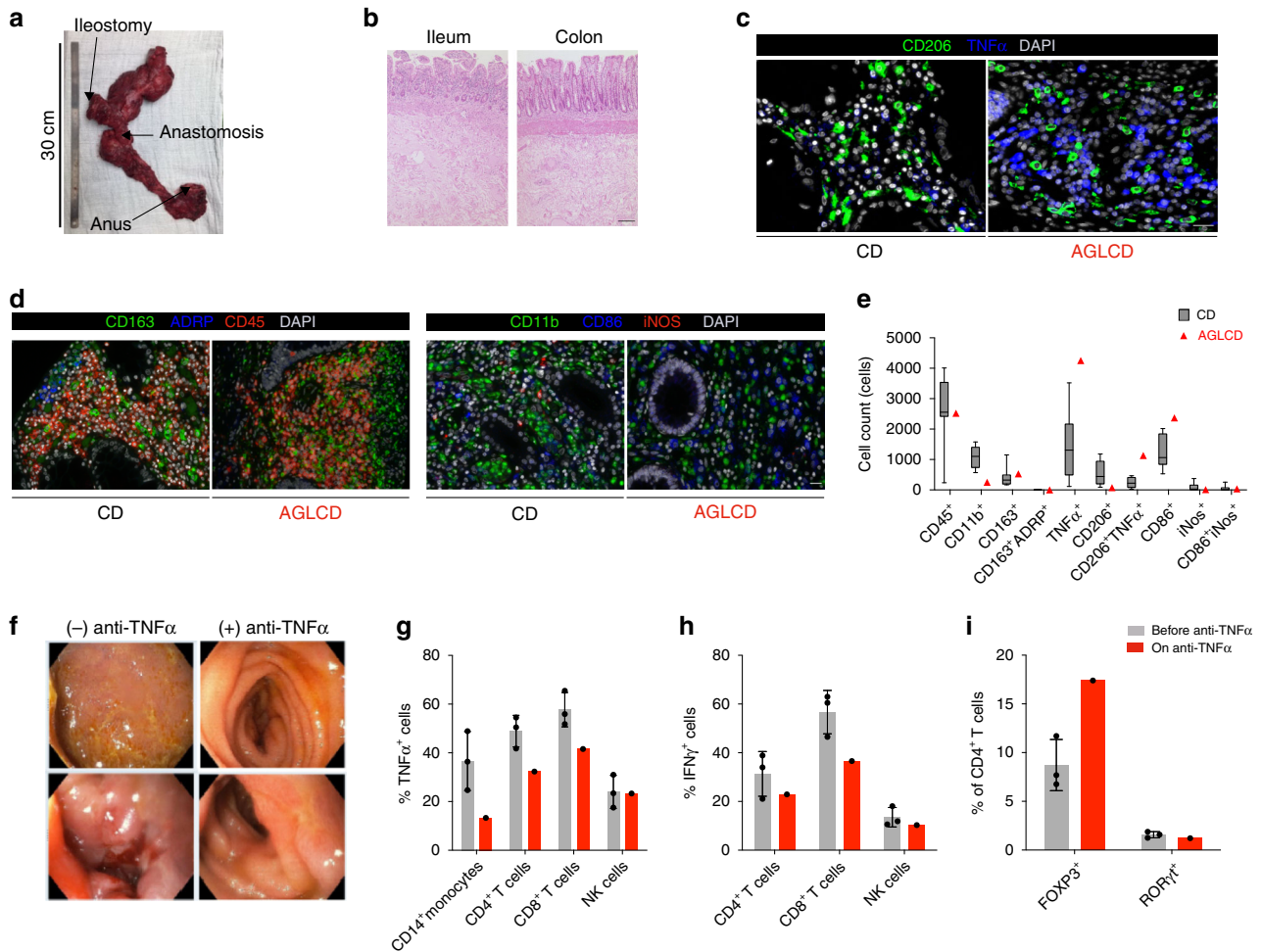
**Stable remission of the AGLCD patient under TNF $\alpha$ -blockade.** Following surgery, the patient continued rLeptin substitution to improve insulin sensitivity and subsequently again developed mucosal inflammation beginning at the terminal ileostomy, further supporting the concept of rLeptin-driven intestinal inflammation. Due to the increased production of TNF $\alpha$  that we had noted upon rLeptin substitution earlier, we decided to initiate anti-TNF $\alpha$  therapy with adalimumab, resulting in stable clinical and endoscopic remission after 6 months of therapy (Fig. 4f). Moreover, TNF $\alpha$  blockade not only inhibited TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  production in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells but also increased the frequency of FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in the AGLCD patient as determined by flow cytometry (Fig. 4g–i).

## Discussion

In summary, our results shed light on the complex regulatory role of fat tissue in intestinal inflammation, as well as on the immune stimulatory effects of rLeptin on human immune cell composition, function and metabolism (as summarized in Supplementary Fig. 10). Farooqi et al. have previously demonstrated that leptin substitution promotes T cell proliferation and cytokine production in three patients with congenital leptin deficiency. However, in the absence of a concomitant inflammatory disease, no inflammatory response was detected in vivo<sup>16</sup>. Likewise, Oral et al. have observed increased TNF $\alpha$  production in PBMCs in a cohort of 10 patients with generalized lipodystrophy after four months of treatment with rLeptin without noticing an induction or exacerbation of comorbid inflammatory diseases and consequently no autoimmune complications were reported<sup>40</sup>. Our results now indicate that, in the setting of a pre-existing inflammatory condition, leptin therapy fuels inflammation and increases disease activity in autoimmunity via the induction of TNF $\alpha$ -producing cells and by metabolically priming immune cells towards a pro-inflammatory phenotype. Consistently, Javor et al. have previously speculated that rLeptin substitution might have contributed to the deterioration of membranoproliferative glomerulonephritis by inducing autoimmunity in two patients with generalized lipodystrophy in a study investigating the effects of

rLeptin substitution on the renal function of lipodystrophic patients<sup>41</sup>. Of note, the AGLCD patient received immunosuppressive medication throughout our study, which is likely to have affected his immune cell composition. However, the medication was not modified during the course of our study and the described pro-inflammatory effects of rLeptin were observed despite immunosuppression with mycophenolate mofetil (MMF) and tacrolimus. Furthermore, we cannot fully exclude that treatment with MMF contributed to intestinal inflammation in the AGLCD patient as MMF-therapy has been associated with chronic diarrhea, which can be reversed by anti-TNF $\alpha$  therapy<sup>42,43</sup>. However, we believe that the histologic presence of granulomas (Supplementary Fig. 11), the fistulizing nature of inflammation (Fig. 1a), as well as the occurrence of intestinal autoimmunity prior to the start of MMF strongly argue against MMF-driven intestinal inflammation in the AGLCD patient, since none of these features can be observed in MMF-induced colitis<sup>44</sup>. Even if we do not consider MMF to trigger intestinal inflammation in the AGLCD patient, anti-TNF therapy would have been beneficial both for treating leptin-induced inflammation, as well as potential side effects caused by MMF.

Since our findings are based on observations in a single patient with AGLCD with an extremely complicated clinical course (Fig. 1d), the generalizability of our findings might be limited and it would be important to further validate our findings in additional patients with acquired generalized lipodystrophy and concomitant autoimmune disease, which is unfortunately difficult to perform due to the extreme rarity of these patients and the singularity of the AGLCD patient. However, we are convinced that our results still provide valuable insights regarding the immune-stimulatory potential of leptin in human intestinal inflammation, which are supported by observations in mice as leptin-deficient *ob/ob* mice are protected from DSS-induced colitis<sup>6</sup> and the pharmacologic inhibition of the leptin receptor attenuates disease severity in *Il10*<sup>−/−</sup> mouse models of colitis<sup>7</sup>. In our opinion, leptin thereby does not directly trigger inflammation (otherwise rLeptin replacement should cause autoimmunity in all forms of lipodystrophy, which is not the case), but is instead enhancing autoimmunity by facilitating the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and by regulating immune cell differentiation and cellular expansion of auto-reactive lymphocytes. In addition, our observations also argue in favor of a broader role of leptin for proper immune cell function as leptin deficiency is associated with a decreased and impaired NK compartment both in the AGLCD patient and leptin receptor-deficient *db/db* mice<sup>22</sup>, suggesting that leptin-deficiency might be considered as a cause of functional immune deficiency. Accordingly, patients with malnutrition and consecutive low levels of leptin suffer from an increased susceptibility for severe infections



**Fig. 4** TNF $\alpha$ -driven intestinal inflammation during rLeptin treatment is reversed by anti-TNF $\alpha$  therapy. **a–e** Sustained inflammation under rLeptin substitution and previously acquired structural damage (stenosis and fistula-induced abscess) made proctocolectomy and ileal resection necessary 16 days after initiation of rLeptin therapy. The specimen (**a**) was analyzed histologically by H&E staining (scale bar depicts 100  $\mu$ m) (**b**), showing severe inflammation, and by immunohistochemistry (IHC; **c–e**). **c** Microscopic pictures of IHC staining for TNF $\alpha$  and CD206 in gut tissue from the AGLCD patient and a Crohn’s disease (CD) patient (The scale bar depicts 20  $\mu$ m, images were recorded using an Axiolmager Z1 from Zeiss). **d** Additional pictures of IHC staining for different immune cell markers (recorded with the Vectra3 system from PerkinElmer, the scale bar displays 20  $\mu$ m) and (**e**) quantification of cells staining positive for respective markers per 10 high power fields (For CD45, CD163 and ADRP stainings a total of 11 tissue samples from  $n = 7$  biologically independent CD control patients was compared to the AGLCD patient ( $n = 1$ ); for TNF $\alpha$  and CD206 stainings a total of 9 samples of  $n = 6$  independent CD patients was obtained and compared to the AGLCD patient ( $n = 1$ ); for CD11b, CD86 and iNOS stainings a total of 6 samples from  $n = 3$  biologically independent CD patients was compared to the AGLCD patient ( $n = 1$ ); in case that several samples were analyzed from the same patients, tissues were derived from different anatomical locations, blinded analysis). The box extends from the 25th to 75th percentiles. Whisker plots show the min (smallest) and max (largest) values. The line in the box denotes the median. **f–i** Following surgery, rLeptin treatment was continued and the patient presented with new inflammation beginning at the terminal ileostomy. The clinical decision was made to initiate anti-TNF $\alpha$  therapy while continuing rLeptin substitution, resulting in clinical and endoscopic remission of Crohn’s disease. **f** Comparison of pictures taken during endoscopy before starting anti-TNF $\alpha$  therapy and six months later. **g–i** Flow cytometric analysis of the effects of anti-TNF $\alpha$  therapy on (**g**) TNF $\alpha$  and (**h**) IFN $\gamma$  production after ex vivo stimulation, as well as (**i**) the expression of the transcription factors FOXP3 and ROR $\gamma$ t (“before anti-TNF $\alpha$ ” combines data from three different time points). Error bars on column charts display the standard deviation (SD). The source data are provided as a Source Data file.

including leishmaniasis and amebiasis due to impaired T and NK cell functions<sup>45</sup>.

We are aware, that our study does not allow to discriminate between direct and indirect effects of rLeptin substitution on immune cells as a variety of confounding metabolic factors could contribute to the observed immune stimulatory function of leptin in the AGLCD patient including the leptin-mediated regulation of appetite, blood lipids, glucose and insulin sensitivity. However, Reis and colleagues could recently unambiguously show, that leptin has direct primary effects on the function and differentiation of lymphocytes in intestinal autoimmunity as leptin-receptor deficient CD4<sup>+</sup> T cells from *Lepr<sup>fl/fl</sup>-CD4-Cre* mice fail to

induce intestinal inflammation in transfer models of colitis<sup>46</sup>. Accordingly, our group has observed a significantly delayed onset of colitis in *scid* mice after the transfer of CD4<sup>+</sup> T cells from Leptin-receptor deficient *db/db* mice due to a defective production of inflammation-promoting cytokines including IFN $\gamma$ <sup>11</sup> further supporting the pro-inflammatory function of leptin in inflammatory bowel disease.

Our results furthermore help to better understand the complex role of mesenteric fat in intestinal inflammation, as it is difficult to study in animal models. Remarkably, Paul et al. have previously described that leptin is elevated in creeping fat of Crohn’s disease patients<sup>47</sup>. Accordingly, CD patients with a high burden

of creeping fat also display elevated levels of leptin in the serum and the amount of visceral fat is directly correlated with a higher disease activity<sup>48</sup>. In line with this observation that creeping fat serves as a local source for leptin and other pro-inflammatory cytokines, Coffey and colleagues have recently registered in a small retrospective study that a radical resection of the mesentery and creeping fat in CD patients increases the recurrence free survival of patients<sup>49</sup>. Our group has previously observed in mice, that intestinal inflammation and subsequent bacterial translocation into the mesenteric fat induces the local production of leptin by adipocytes in a TLR-dependent manner in DSS treated wild-type mice but not in *Myd88*<sup>-/-</sup> mice<sup>50</sup>. Given the high infiltrations of creeping fat with lymphocytes such as CD8<sup>+</sup> T cells and monocytes<sup>51</sup>, it is plausible to argue that local leptin production affects the differentiation, as well as the functionality of fat residing lymphocytes, especially in regard to the observation that T cells express leptin receptors and that leptin receptor-deficient T cells fail to induce colitis in mice<sup>11,46</sup>. However, additional studies are required to decipher the immune-modulatory function of creeping fat in the pathogenesis of Crohn's disease which is likely to consist of cumulative effects of additional adipokines and metabolites that are secreted by creeping fat.

Taken together, we believe that our findings might have important implications for the treatment of patients receiving rLeptin substitution. Since acquired generalized lipodystrophy is associated with autoimmune and inflammatory diseases in about 25% of cases<sup>19</sup>, there may be more lipodystrophy patients in whom rLeptin therapy is accompanied by an increased activity of a concomitant inflammatory disease. Therefore, our study provides first evidence that in such cases anti-TNF $\alpha$  therapy should be considered to control autoimmunity while maintaining rLeptin substitution for the metabolic control of lipodystrophy.

## Methods

**Ethical regulations.** Written informed consent was obtained from all patients and healthy volunteers and included the consent to publish clinical information potentially identifying individuals. All experiments were approved by the institutional review board of the Charité-Universitätsmedizin Berlin and conducted accordingly. The authors complied to all relevant ethical regulations for research involving human participants.

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Serum was obtained from peripheral blood of the AGLCD patient before and after rLeptin (metreleptin from Aegerion Pharmaceuticals) treatment, as well as from 7 CD patients and 5 healthy controls. Serum levels of leptin were determined using the Human Leptin DuoSet ELISA Kit (R&D Systems).

**Isolation of peripheral blood mononuclear cells.** Heparinized blood was obtained from the AGLCD patient at different time points before and after leptin reconstitution. Blood of healthy donors, and CD patients served as controls. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using Biocoll (Merck). Cells were either frozen in RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific) substituted with 20% fetal bovine serum (FBS; Sigma) and 10% dimethyl sulfoxide (Sigma) and stored in liquid nitrogen or used directly. For mass cytometry, cells were fixed and frozen using SmartTube buffer and subsequently stored at -80 °C according to our previously published protocol<sup>21</sup>.

**Intracellular barcoding for mass cytometry.** SmartTube buffer-fixed PBMCs of the AGLCD patient before and after rLeptin substitution, as well as cells of 6 CD patients and 5 HD were thawed and subsequently stained with pre-made combinations of six different palladium isotopes: <sup>102</sup>Pd, <sup>104</sup>Pd, <sup>105</sup>Pd, <sup>106</sup>Pd, <sup>108</sup>Pd, and <sup>110</sup>Pd (Cell-ID 20-plex Pd Barcoding Kit, Fluidigm). After 30 min staining at room temperature (RT), individual samples were washed twice with cell staining buffer (0.5% bovine serum albumin in PBS, containing 2 mM EDTA). Samples were pooled together, washed and further stained with antibodies. Anti-human antibodies (Supplementary Table 2) were purchased either pre-conjugated to metal isotopes (Fluidigm) or from commercial suppliers in purified form and conjugated in house using the MaxPar X8 kit (Fluidigm) according to the manufacturer's protocol.

**Surface and intracellular staining for mass cytometry.** After cell barcoding, washing and pelleting, the combined samples were re-suspended in 100  $\mu$ l of antibody cocktail against surface markers (Supplementary Table 2) and incubated for 30 min at 4 °C. Then, cells were washed twice with cell staining buffer. For intracellular staining, the stained (non-stimulated) cells were then incubated in fixation/permeabilization buffer (Fix/Perm Buffer, eBioscience) for 60 min at 4 °C. Cells were then washed twice with permeabilization buffer (eBioscience). The samples were then stained with antibody cocktails against intracellular molecules (Supplementary Table 2) in permeabilization buffer for 1 h at 4 °C. Cells were subsequently washed twice with permeabilization buffer and incubated overnight in 2% methanol-free formaldehyde solution (ThermoFisher). Fixed cells were then washed and re-suspended in 1 ml iridium intercalator solution (Fluidigm) for 1 h at RT. Next, the samples were washed twice with cell staining buffer and then twice with ddH<sub>2</sub>O (Fluidigm). Cells were pelleted and kept at 4 °C until CyTOF measurement.

**CyTOF measurement.** Cells were analyzed using a CyTOF2 upgraded to Helios specifications, with software version 6.5.236. The instrument was tuned according to the manufacturer's instructions with tuning solution (Fluidigm) and measurement of EQ four element calibration beads (Fluidigm) containing <sup>140/142</sup>Ce, <sup>151/153</sup>Eu, <sup>165</sup>Ho, and <sup>175/176</sup>Lu served as a quality control for sensitivity and recovery. Directly prior to analysis cells were re-suspended in ddH<sub>2</sub>O, filtered (20  $\mu$ m Cell-trix, Sysmex), counted and adjusted to 3–5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml. EQ four element calibration beads were added at a final concentration of 1:10 of the sample volume to be able to normalize the data to compensate for signal drift and day-to-day changes in instrument sensitivity. Samples were acquired with a flow rate of 300–400 events/s. Lower convolution threshold was set to 400, with noise reduction mode on and cell definition parameters set at event duration of 10–150. The resulting flow cytometry standard (FCS) files were normalized and randomized using the CyTOF software's internal FCS-Processing module on the non-randomized ('original') data. Settings were used according to the default settings in the software with time interval normalization (100 s/minimum of 50 beads) and passport version 2. Intervals with less than 50 beads per 100 s were excluded from the resulting fcs-file. Cytobank ([www.cytobank.org](http://www.cytobank.org)) was used for initial manual gating on live single cells, de-barcoding and viSNE to generate t-SNE maps. FCS files containing the t-SNE embedding as additional two parameters were exported from Cytobank for downstream exploratory and statistical analyses using GraphPad Prism 6.

**Flow cytometry.** For the assessment of cytokine production, PBMCs of the AGLCD patient before and after rLeptin substitution, as well as PBMCs from 5 CD patients and 6 HD were thawed and cultured for 4 h in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and containing 20 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) and 1  $\mu$ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) or 100 ng/ml lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich). Brefeldin A (10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) was added for 2 h prior to harvesting. Cells were then stained for viability using a fixable dye (LIVE/DEAD<sup>™</sup> aqua; ThermoFisher Scientific or Zombie Violet<sup>™</sup>; BioLegend). Subsequently, lineage markers (Supplementary Table 3) were stained and the Foxp3 Staining Set (ThermoFisher Scientific) was applied for fixation and intracellular and intranuclear staining according to the manufacturer's protocol (Supplementary Table 3). Samples were measured using a Canto II flow cytometer (BD Bioscience). Data were analyzed using the FlowJo software package V10.1 (FlowJo, LLC).

**Lipid droplet formation.** Thawed PBMCs were incubated for 30 min with 0.2  $\mu$ g/ml BODIPY dye (ThermoFisher Scientific) and subsequently stained and analyzed by flow cytometry, as described above. The difference of mean fluorescence intensity (MFI) between BODIPY stained and all-but-BODIPY-stained samples ( $\Delta$ MFI) served as a measure of lipid droplet content.

**Glucose influx.** To assess glucose uptake in immune cells, PBMCs of the AGLCD patient or a HD were glucose starved for 30 min in PBS. Subsequently, 100  $\mu$ M of the fluorescent glucose analog 2-NBDG (ThermoFisher Scientific) was added to the cells and the MFI of 2-NBDG was assessed in different immune cell subsets using flow cytometry. The  $\Delta$ MFI calculates as described for BODIPY experiments.

**Calcium measurements.** For calcium measurements, thawed PBMCs of a HD and the AGLCD patient were loaded for 30 min with the calcium sensing dye Fluo-4 AM (2  $\mu$ g/ml; ThermoFisher Scientific) and subsequently stained for lineage markers. Calcium influx was measured by flow cytometry as previously described<sup>52</sup>. The experiment was performed in technical duplicates. Data were analyzed with FlowJo V8.8.7.

**Cytometric bead array.** Concentrations of G-CSF, MIG, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  were measured in serum of the AGLCD patient before and 4 days after rLeptin substitution by using the FlowCytomix multi-plex kit from eBioscience according to the manufacturer's protocol. Data were analyzed using the FCAP Array<sup>™</sup> software V3.0 from BD Biosciences.

**Seahorse analysis.** Monocytes, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMCs of healthy donors using bead-based positive selection kits for CD14<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, or CD8<sup>+</sup> cells, respectively (Miltenyi Biotec). Monocytes were polarized into macrophages by adding 10 ng/ml GM-CSF (PeproTech) to the medium, while T cells were activated by stimulation with plate bound anti-CD3 (from eBioscience, clone OKT3) and anti-CD28 (from BD Bioscience, clone CD28.2) antibodies for 3 days and subsequently expanded for 4 days in media containing 20 ng/ml IL-2 (PeproTech). Throughout all experiments, RPMI 1640 media was supplemented either with 10% serum obtained from the AGLCD patient before or after rLeptin reconstitution ( $\pm$ rLeptin), with AGLCD serum ( $-$ rLeptin) that had been supplemented with 1  $\mu$ g/ml leptin in vitro or with serum from healthy donors (HD). After 6 or 7 days of culture, the oxygen consumption rate and the extracellular acidification rate was assessed in at least triplicates on a 96-well Seahorse FX plate reader using the Cell Mito Stress Test Kit (Agilent).

**Histopathology.** Paraffin blocks of intestinal tissues derived from the AGLCD patient and 6–11 samples from different anatomical sites of 3 to 7 CD patients were cut and stained with hematoxylin and eosin (H&E) or by immunohistochemistry using antibodies listed in Supplementary Table 4. For antibody detection, the Opal 4-Color Manual IHC Kit (PerkinElmer) was used. Multispectral images were acquired using a Vectra<sup>®</sup> 3 imaging system (PerkinElmer). Positive cells were quantified in 10 high power fields (field of vision in  $\times$ 400 original magnification) by inForm software (PerkinElmer). All evaluations were performed in a blinded manner. For the acquisition of immunofluorescence images depicted in Fig. 4d an AxioImager Z1 (Zeiss) was used.

**Scratch assay.** Human T84 colon epithelial cells were obtained from ATCC and cultured in 24-well plates and scratches were induced using small pipet tips. 1  $\mu$ g/ml recombinant human leptin or vehicle was added (Peprotech). Pictures of each scratch were taken at the start and end (8 days or until first scratch was closed) using the AxioCam 105-color camera on a Zeiss Primovert microscope. Scratch areas were determined using the MiToBo Scratch Assay Analyzer (ImageJ) and changes in scratch area ( $\Delta$ area) were normalized to the mean  $\Delta$ area of the control group.

**Transepithelial electric resistance measurements.** Human T84 cells were cultured as a monolayer on transwell inserts (5- $\mu$ m pores from Sigma) placed in a 24-well plate containing DMEM high glucose medium (4.5 g/l glucose; from ThermoFisher Scientific), 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. At baseline, 1  $\mu$ g/ml leptin or vehicle (PBS) was added to cells. To induce epithelial leakage, 2 ng/ml recombinant human TNF $\alpha$  and 2 ng/ml IFN $\gamma$  (both from Peprotech) were added to the medium. Electrical resistance was measured between an electrode in the well and an electrode in the transwell at baseline, after 24 and 48 h, respectively. Transepithelial electric resistance (TEER) was determined as the measured electrical resistance minus the resistance in uncultured condition (130  $\Omega$ ) multiplied with the area of the transwell (0.6 cm<sup>2</sup>). Results were normalized to the TEER at baseline of that respective well.

**Statistical analysis and graphs.** Statistical analysis and graphic data representation were done using GraphPad Prism version 7.00. Where not indicated otherwise, two-tailed unpaired *t*-tests without correction for multiple comparison were used. For Seahorse analysis, a two-way ANOVA with post-tests comparing against “AGLCD ( $-$ rLeptin)” as control with the Holm-Sidak correction for multiple comparison was applied. Results were considered statistically significant if *p* < 0.05.

**Exome sequencing.** Blood-derived DNA was extracted from the patient, as well as his healthy mother, sister and brother. Exome enrichment for these four samples was performed using the IDT xGen Exome Research Panel v 1.0 and 2  $\times$  75 bp paired-end sequencing was carried out on an Illumina HiSeq 3000. The reads were mapped against the human reference genome build hg19 using BWA<sup>53</sup>, sorted, converted to bam format and indexed with SAMtools<sup>54</sup>, followed by the removal of PCR duplicates, local realignment around InDels and base quality score recalibration with the GATK<sup>55</sup> according to their best practice recommendations followed by variant calling and variant quality score recalibration. Variant annotation and filtering were performed using Alissa Interpret (Agilent).

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The source data underlying Figs. 1b, 1f–l, 2a–e, 3a–e, 3g–h, 3j–k, 3m, 4e, 4g–i and Supplementary Figs. 1A–E, 2A–C, 4A, 4C–E, 5, 6A–C, 6E, 7, 8 and 9A are provided as a Source Data file. All mass and flow cytometric data sets, as well as exome sequencing results generated and analyzed during this study are available from the corresponding authors on reasonable request that does not include confidential patient information as the AGLCD patient and his relatives did not consent to a deposition of their personal data on a public repository.

Received: 9 July 2019; Accepted: 14 November 2019;  
Published online: 10 December 2019

## References

- Zhang, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
- Fazolini, N. P. et al. Leptin activation of mTOR pathway in intestinal epithelial cell triggers lipid droplet formation, cytokine production and increased cell proliferation. *Cell Cycle* **14**, 2667–2676 (2015).
- Lord, G. M. et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* **394**, 897–901 (1998).
- Sheehan, A. L., Warren, B. F., Gear, M. W. & Shepherd, N. A. Fat-wrapping in Crohn’s disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *Br. J. Surg.* **79**, 955–958 (1992).
- Weidinger, C., Ziegler, J. F., Letizia, M., Schmidt, F. & Siegmund, B. Adipokines and their role in intestinal inflammation. *Front. Immunol.* **9**, 1974 (2018).
- Siegmund, B., Lehr, H. A. & Fantuzzi, G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* **122**, 2011–2025 (2002).
- Singh, U. P. et al. Leptin antagonist ameliorates chronic colitis in IL-10(-)/(-) mice. *Immunobiology* **218**, 1439–1451 (2013).
- Matarese, G. et al. Leptin potentiates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL female mice and confers susceptibility to males. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1324–1332 (2001).
- Batra, A. et al. Leptin: a critical regulator of CD4<sup>+</sup> T-cell polarization in vitro and in vivo. *Endocrinology* **151**, 56–62 (2010).
- Deng, J. et al. Leptin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancement of Th17 cell response. *Arthritis Rheum.* **64**, 3564–3573 (2012).
- Siegmund, B. et al. Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* **53**, 965–972 (2004).
- Matarese, G. et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 5150–5155 (2005).
- Sitaraman, S. et al. Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J.* **18**, 696–698 (2004).
- Ghesquiere, B., Wong, B. W., Kuchnio, A. & Carmeliet, P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* **511**, 167–176 (2014).
- Gerriets, V. A. et al. Leptin directly promotes T-cell glycolytic metabolism to drive effector T-cell differentiation in a mouse model of autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1970–1983 (2016).
- Farooqi, I. S. et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Investig.* **110**, 1093–1103 (2002).
- Oral, E. A. et al. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N. Engl. J. Med.* **346**, 570–578 (2002).
- Garg, A. Clinical review: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 3313–3325 (2011).
- Misra, A. & Garg, A. Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature. *Medicine* **82**, 129–146 (2003).
- Kredel, L. I. & Siegmund, B. Adipose-tissue and intestinal inflammation-visceral obesity and creeping fat. *Front. Immunol.* **5**, 462 (2014).
- Böttcher, C. et al. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat. Neurosci.* **22**, 78–90 (2019).
- Tian, Z., Sun, R., Wei, H. & Gao, B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 297–302 (2002).
- Guaraldi, G. et al. CD8 T-cell activation is associated with lipodystrophy and visceral fat accumulation in antiretroviral therapy-treated virologically suppressed HIV-infected patients. *J. AIDS* **64**, 360–366 (2013).
- Gerner, R. R. et al. NAD metabolism fuels human and mouse intestinal inflammation. *Gut* **67**, 1813–1823 (2018).
- Schneider, M. et al. CD38 is expressed on inflammatory cells of the intestine and promotes intestinal inflammation. *PLoS ONE* **10**, e0126007 (2015).
- Hellmann, J. et al. CCR7 maintains nonresolving lymph node and adipose inflammation in obesity. *Diabetes* **65**, 2268–2281 (2016).
- Michelet, X. et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat. Immunol.* **19**, 1330–1340 (2018).
- Greineisen, W. E. et al. Lipid body accumulation alters calcium signaling dynamics in immune cells. *Cell Calcium* **56**, 169–180 (2014).
- Vaeth, M. et al. Store-operated Ca(2+) entry controls clonal expansion of T cells through metabolic reprogramming. *Immunity* **47**, 664–679 e666 (2017).

30. Chini, E. N. CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 57–63 (2009).
31. Sandoval-Montes, C. & Santos-Argumedo, L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 513–521 (2005).
32. Chatterjee, S. et al. CD38-NAD(+)axis regulates immunotherapeutic anti-tumor T cell response. *Cell Metab.* **27**, 85–100 e108 (2018).
33. Zhao, Y., Sun, R., You, L., Gao, C. & Tian, Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 247–252 (2003).
34. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
35. Monticelli, L. A. et al. Arginase 1 is an innate lymphoid-cell-intrinsic metabolic checkpoint controlling type 2 inflammation. *Nat. Immunol.* **17**, 656–665 (2016).
36. Kredel, L. I. et al. Adipokines from local fat cells shape the macrophage compartment of the creeping fat in Crohn's disease. *Gut* **62**, 852–862 (2013).
37. Kang, K. et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* **7**, 485–495 (2008).
38. Wu, H. et al. Oleate but not stearate induces the regulatory phenotype of myeloid suppressor cells. *Sci. Rep.* **7**, 7498 (2017).
39. Barrenetxe, J. et al. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut* **50**, 797–802 (2002).
40. Oral, E. A. et al. Leptin replacement therapy modulates circulating lymphocyte subsets and cytokine responsiveness in severe lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 621–628 (2006).
41. Javor, E. D. et al. Proteinuric nephropathy in acquired and congenital generalized lipodystrophy: baseline characteristics and course during recombinant leptin therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3199–3207 (2004).
42. Dalle, I. J., Maes, B. D., Geboes, K. P., Lemahieu, W. & Geboes, K. Crohn's-like changes in the colon due to mycophenolate? *Colorectal Dis.* **7**, 27–34 (2005).
43. Bouhboh, S. & Rookmaaker, M. B. Rapid resolution of persistent mycophenolate mofetil-induced diarrhoea with a single dose of infliximab. *Nephrol. Dial. Transpl.* **25**, 3437–3438 (2010).
44. Selbst, M. K. et al. Spectrum of histologic changes in colonic biopsies in patients treated with mycophenolate mofetil. *Mod. Pathol.* **22**, 737–743 (2009).
45. Maurya, R., Bhattacharya, P., Dey, R., Nakhasi, H. L. Leptin functions in infectious diseases. *Front Immunol.* **9**, 2741 (2018).
46. Reis, B. S. et al. Leptin receptor signaling in T cells is required for Th17 differentiation. *J. Immunol.* **194**, 5253–5260 (2015).
47. Paul, G. et al. Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **12**, 471–477 (2006).
48. Buning, C. et al. Visceral adipose tissue in patients with Crohn's disease correlates with disease activity, inflammatory markers, and outcome. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 2590–2597 (2015).
49. Coffey, C. J. et al. Inclusion of the mesentery in ileocolic resection for Crohn's disease is associated with reduced surgical recurrence. *J. Crohn's Colitis* **12**, 1139–1150 (2018).
50. Batra, A. et al. Mesenteric fat-control site for bacterial translocation in colitis? *Mucosal Immunol.* **5**, 580–591 (2012).
51. Kredel, L. I. et al. T-cell composition in ileal and colonic creeping fat-separating ileal from colonic Crohn's disease. *J. Crohn's Colitis* **13**, 79–91 (2019).
52. Desvignes, L. et al. STIM1 controls T cell-mediated immune regulation and inflammation in chronic infection. *J. Clin. Invest.* **125**, 2347–2362 (2015).
53. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
54. Li, H. et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
55. McKenna, A. et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).

## Acknowledgements

This work was funded by the German Research Foundation (We 5303/3-1 to C.W., Si 749/10-1 to B.S., SFB-TRR 241 B01 and INF to A.A.K., B.S. and C.W.), and the German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development to B.S. and R.G., J.Z. was funded by a scholarship from the Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, C.W. received funding by the Clinician Scientist Program of the Berlin Institute of Health. C.B. and J.P. were supported by the German Research Foundation (SFB-TRR167, B05 and B07). J.P. received additional funding from the Berlin Institute of Health (CRG2aSP6) and the UK DRI (Momentum Award). A.A.K., B.S., and P.A. were supported by the German Research Foundation (SFB-1340, B06 and B07), F.T., B.P., B.F., M.F., A.F. were supported by the DFG Cluster of Excellence "Inflammation at Interfaces" and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (E.med/SysInflame, 012 × 1306 F). We would like to acknowledge the assistance of the BIH Cytometry Core Facility (BIH and Charité–Universitätsmedizin Berlin, Germany).

## Author contributions

J.F.Z., C.B., M.L., C.Y., H.W., I.F., Y.R.S., A.A.K., D.K., R.G., F.T., B.L. performed experiments, J.F.Z., C.B., M.L., C.Y., H.W., A.A.K., R.G., F.T., B.F., B.L., B.S., and C.W. designed and analyzed experiments, J.F.Z., A.K.S., M.E.K., I.F., Y.R.S., I.A., C.Boj., P.A., A.A.K., K.M., M.S., B.S., C.W. contributed to sample acquisition and the clinical management of the AGLCD patient, J.P., I.A., P.A., R.G., B.F., M.F., and A.F. helped with data interpretation, J.F.Z., C.B., B.S., and C.W. wrote the paper.

## Competing interests

K.M. consulted for Aegerion Pharmaceuticals. B.S. has served as consultant for Abbvie, Boehringer, Celgene, Falk, Janssen, Lilly, Pfizer, Prometheus, Takeda and received speaker's fees from Abbvie, CED Service GmbH, Falk, Ferring, Janssen, Novartis, Takeda (B.S. served as representative of the Charité). The remaining authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13559-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.S. or C.W.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## 6. Lebenslauf

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



## 7. Publikationsliste

- Ziegler, J. F., Böttcher, C., Letizia, M., Yerinde, C., Wu, H., Freise, I., Rodriguez-Sillke, Y., Stoyanova, A. K., Kreis, M. E., Asbach, P., Kunkel, D., Priller, J., Anagnostopoulos, I., Kühl, A. A., Miehle, K., Stumvoll, M., Tran, F., Fredrich, B., Forster, M., Franke, A., Bojarski, C., Glaben, R., Löscher, B. S., Siegmund, B. & Weidinger, C. Leptin induces TNF $\alpha$ -dependent inflammation in acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn's disease. *Nat Commun* **10**, 5629, doi:10.1038/s41467-019-13559-7 (2019).

Impact Factor (2019): 12.121

- Weidinger, C., Ziegler, J. F., Letizia, M., Schmidt, F. & Siegmund, B. Adipokines and Their Role in Intestinal Inflammation. *Front Immunol* **9**, 1974, doi:10.3389/fimmu.2018.01974 (2018).

Impact Factor (2018): 4.716

## **8. Danksagungen**

In erster Linie möchte ich mich bei meinen Betreuern Frau Prof. Dr. Britta Siegmund und Herrn Dr. Carl Weidinger für die Möglichkeit zur Promotion mit diesem spannenden und vielseitigen Thema, die überaus gute und freundliche Betreuung sowie für ihre stets konstruktiven und wertvollen Anregungen bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Rainer Glauben und Inka Freise, die mir bei Fragen zu Labortechniken und Geräten jederzeit unterstützend zur Seite standen, sowie auch allen weiteren Mitarbeitern der AG Siegmund für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen guten wissenschaftlichen wie privaten Gespräche. Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Chotima Böttcher für die gute und harmonische Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes bedanken, ebenso bei Marilena Letizia, Cansu Yerinde, Dr. Hao Wu, Yasmina Rodriguez-Sillke, PD Dr. Anja Kühl und allen weiteren Co-Autoren der Publikation. Weiterhin möchte ich der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin meinen Dank aussprechen für die Unterstützung in Form des Peter-Scriba-Promotionsstipendiums.

Abschließend gilt mein ausdrücklicher Dank meinen Eltern und Großeltern, meinem Bruder sowie der gesamten Familie, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben und ohne die diese Promotion so nicht möglich gewesen wäre.