Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und
Kinderkardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

**Interleukin-7 vermittelte Effekte auf Polarisierung und
Funktionen von Monozyten von an Typ 1 Diabetes erkrankten
Kindern**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Paul Hehenkamp

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Marc Jacobsen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Markus Uhrberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hehenkamp P, Hoffmann M, Kummer S, Reinauer C, Döing C, Förtsch K, Enczmann J, Balz V, Mayatepek E, Meissner T, Jacobsen M, Seyfarth J. Interleukin-7-dependent nonclassical monocytes and CD40 expression are affected in children with type 1 diabetes. *Eur J Immunol.* 2021 Dec;51(12):3214-3227. doi: 10.1002/eji.202149229. Epub 2021 Nov 1. PMID: 34625948.

Zusammenfassung (Deutsch)

Der Typ 1 Diabetes ist eine Erkrankung mit einer steigenden Inzidenz und einer Vielzahl von einhergehenden Komplikationen. Trotz intensiver Forschung ist die Pathogenese des Typ 1 Diabetes bisher noch nicht in Gänze verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass Interleukin 7 (IL-7) eine Rolle in der Entstehung des Typ 1 Diabetes spielen könnte. Neue Studien zeigen, dass ein mit Autoimmunität-assoziiertes genetischer Polymorphismus im IL-7 Rezeptor (IL-7R) Gen die Expression des IL-7R auf Monozyten beeinflusst. Die Rolle von Interleukin-7 vermittelten Effekten auf Monozyten sowie deren Relevanz für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes ist jedoch noch unklar und bisher wenig untersucht. In dieser Arbeit wurden Monozyten von an Typ 1 Diabetes erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen mittels Durchflusszytometrie, *real-time quantitative PCR* (qPCR) und *t-distributed Stochastic Neighbor-Embedded* (t-SNE) Analyse sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* unter Verwendung verschiedener Stimuli untersucht. Stimulation mit LPS führte generell zu einer höheren IL-7R Expression. Bei Monozyten von an Typ 1 Diabetes erkrankten Patienten wurde eine niedrigere Expression des IL-7R auf mit IL-7 stimulierten Monozyten detektiert, wobei dieser Unterschied am deutlichsten bei den nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten nachweisbar war. In Anwesenheit von Interleukin-7 nahm die Zellzahl sowohl der nicht-klassischen/nicht-intermediären als auch der klassischen Monozyten zu, während Monozyten mit einem intermediären Phänotyp zahlenmäßig abnahmen. IL-7 führte außerdem zu phänotypischen Veränderungen u.a. zu einer Zunahme der CD40 Expression auf Monozyten. Insbesondere bei an T1D erkrankten Patienten ging die hohe CD40 Expression mit einer geringeren IL-7R Expression auf Monozyten einher, während eine positive Korrelation zwischen CD40 und dem IL-7R bei gesunden Kontrollen zu detektieren war. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-7 Einfluss auf Phänotyp und Funktion von Monozyten hat und dass sich Monozyten von an T1D erkrankten Patienten von denen gesunder Kontrollen in ihrer Reaktion auf IL-7 unterscheiden, was Hinweise auf eine mögliche Beteiligung bei der Pathogenese des T1D gibt.

Zusammenfassung (Englisch)

Type 1 diabetes is a disease with growing incidence and is associated with a variety of complications. Despite intensive research, type 1 diabetes pathogenesis is not yet fully understood. The cytokine interleukin 7 (IL-7) is thought to play a role in the development of type 1 diabetes. Recent studies show that an autoimmunity-associated genetic polymorphism within the IL-7 receptor gene (*IL7RA*) influences the activation-induced IL-7R expression on monocytes. The role of IL-7 mediated effects on monocytes as well as the relevance for type 1 diabetes pathogenesis remain unclear and need further investigation. In this study monocytes from type 1 diabetes patients and healthy controls were analyzed *ex-vivo* as well as *in-vitro* using multi-color flow cytometry, real-time quantitative PCR (qPCR) and t-distributed Stochastic Neighbor-Embedded (t-SNE) analysis. IL-7R was generally induced by LPS-mediated activation of monocytes. After IL-7 stimulation, however, monocytes from type 1 diabetes patients displayed lower surface IL-7R expression as compared to healthy controls. This difference was most evident for non-classical/non-intermediate monocytes. Long-term IL-7 stimulation leads to increased cell counts of classical and non-classical/non-intermediate monocytes while cell counts of intermediate monocytes were reduced compared to unstimulated samples. In addition, IL-7 affected the phenotype of monocytes. Amongst others CD40 expression was increased on monocytes and monocytes from type 1 diabetes patients showed inverse correlation between IL-7R and CD40 expression whereas these markers were positively correlated in monocytes from controls.

This study could show that monocytes from type 1 diabetes patients differ in phenotype and response to IL-7 stimulation as compared to healthy controls. This implicates a possible role for IL-7 mediated monocyte effects in type 1 diabetes pathogenesis.

Abkürzungsverzeichnis

CD	<i>cluster of differentiation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IL	Interleukin
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor
JAK	Januskinase
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mIL-7Rα	membranständiger Interleukin-7 Rezeptor Alpha
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
SCID	schwere kombinierte Immundefizienz
sIL-7Rα	löslicher Interleukin-7 Rezeptor Alpha
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
t-SNE	<i>t-distributed Stochastic Neighbor-Embedded</i>
T1D	Typ 1 Diabetes
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>

1	EINLEITUNG	1
1.1	TYP 1 DIABETES	1
1.2	MONOZYTEN	5
1.2.1	Klassische Monozyten	6
1.2.2	Intermediäre Monozyten	7
1.2.3	Nicht-klassische/Nicht-intermediäre Monozyten	7
1.2.4	Monozyten und Autoimmunität.....	8
1.3	INTERLEUKIN-7 UND INTERLEUKIN-7 REZEPTOR.....	8
1.3.1	Interleukin-7 und Autoimmunität	9
1.3.2	Der Interleukin-7 Signalweg.....	10
1.3.3	Einflüsse genetischer Polymorphismen auf den IL-7Ra	11
1.4	CD40 UND CD40-LIGAND.....	12
1.5	CD80 UND CD86	13
1.6	ZIELE DER ARBEIT	14
1.7	ETHIKVOTUM.....	14
2	INTERLEUKIN-7-DEPENDENT NONCLASSICAL MONOCYTES AND CD40 EXPRESSION ARE AFFECTED IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES, HEHENKAMP, P., HOFFMANN, M., KUMMER, S., REINAUER, C., DÖING, C., FÖRTSCH, K., ENCMANN, J., BALZ, V., MAYATEPEK, E., MEISSNER, T., JACOBSEN, M., SEYFARTH, J., EUR. J. IMMUNOL., 51: 3214-3227. (2021).....	15
3	DISKUSSION.....	16
3.1	DIE ROLLE DER MONOZYTENSUBPOPULATIONEN	16
3.1.1	Monozytensubpopulationen ex-vivo.....	16
3.1.2	Einfluss von IL-7 auf die Monozytensubpopulationen und die IL-7R Expression .	17
3.2	EINFLUSS DES RS6897932 AUF DIE IL-7R EXPRESSION.....	20
3.3	T-SNE-ANALYSEN IDENTIFIZIEREN SUBPOPULATION MIT DISTINKTEM PHÄNOTYP.....	21
3.4	BEDEUTUNG FÜR NEUE THERAPIEANSÄTZE	24
3.5	STÄRKEN UND SCHWÄCHEN DER ARBEIT.....	25
3.6	AUSBLICK.....	26
4	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	28
5	DANKSAGUNG.....	35

1 EINLEITUNG

Der Diabetes mellitus ist eine Erkrankung, bei der der Verlust der Kontrollmechanismen des Blutglukosewertes im Vordergrund steht. Die Erkrankung lässt sich in 4 Hauptkategorien unterteilen: Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes, Gestationsdiabetes sowie weitere Typen von Diabetes, die verschiedene Ursachen haben können. Zu letzteren gehören die monogenetischen Diabetes Syndrome, Erkrankungen des exokrinen Pankreas sowie die medikamentös induzierten Diabetesformen. (American Diabetes Association Professional Practice 2022) Für diese Arbeit wurden Blutproben von an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern untersucht, weswegen ich mich im Folgenden auf den Typ 1 Diabetes beziehen werde.

1.1 Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes (T1D) gehört zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Es wird angenommen, dass weltweit ungefähr 1,1 Millionen Kinder und junge Erwachsene unter 20 Jahren an T1D erkrankt sind und in dieser Altersgruppe jährlich ungefähr 128.900 neue Fälle diagnostiziert werden. (Patterson, Karuranga et al. 2019) Die höchste Inzidenz findet sich hierbei bei Kindern zwischen dem 10. und 14. Lebensjahr. (Maahs, West et al. 2010) Für die Altersgruppe unter 14 Jahren wird weltweit von einem jährlichen Anstieg der Inzidenz von circa 3% ausgegangen. (Group 2006) Bei Erstdiagnose der Erkrankung bestehen häufig Hyperglykämie-assoziierte Symptome wie Polyurie, Polydipsie sowie Gewichtsverlust. (DiMeglio, Evans-Molina et al. 2018) Bei ungefähr 40% der Patienten ist eine Ketoazidose bei der Diagnosestellung festzustellen. (Jensen, Stafford et al. 2021) Die Diagnose Diabetes mellitus kann über verschiedene diagnostische Tests erfolgen. Die aktuellen Kriterien der *American Diabetes Association* sind ein Nüchternblutglukosewert ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/L), ein 2h Glukosewert ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L) beim oralen Glukosetoleranztest, ein HBA1C $\geq 6,5\%$ oder ein

Glukosewert von ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) bei gleichzeitigen Symptomen einer Hyperglykämie. Bestehen keine eindeutigen Symptome, muss der Test wiederholt oder ein anderer Test zur Bestätigung durchgeführt werden. Hinweise, dass es sich bei der Diabetesform um einen T1D handelt, können klinische Parameter wie die oben beschriebenen Krankheitssymptome, ein niedriger *Body Mass Index* (< 25 kg/m²) oder ein junges Erkrankungsalter (< 35 Jahren) in Kombination mit Biomarkern wie zum Beispiel Autoantikörper geben. (American Diabetes Association Professional Practice 2022) Für den Typ 1 Diabetes sind 5 sehr häufige Autoantikörpertypen beschrieben: Insulin-Antikörper, Glutamat-Decarboxylase-Antikörper, Tyrosinphosphatase-Antikörper (IA2), Zinktransporter-8-Antikörper sowie Tetraspanin-7-Antikörper. (McLaughlin, Richardson et al. 2016) Sowohl beim Typ 1 als auch beim Typ 2 Diabetes kann es aufgrund der immer wieder auftretenden Hyperglykämien zu zahlreichen Komplikationen kommen. Häufige Komplikationen sind die diabetische Neuropathie, die diabetische Nephropathie, die diabetische Retinopathie sowie vaskuläre Komplikationen. (zusammengefasst in Papatheodorou, Banach et al. 2015) Aufgrund der verminderten oder fehlenden Insulinproduktion benötigen an T1D erkrankte Patienten eine lebenslange Insulinsubstitution. Heutzutage soll die Insulintherapie täglich mit mehreren Injektionen eines schnellwirksamen Insulinanalogons und einem langwirksamen, sogenannten basalen Insulin, oder einer kontinuierlichen subkutanen Insulin-Infusion durch eine Insulinpumpe durchgeführt werden. Zusätzlich sollen die Patienten in ihrer Ernährung und in der Anwendung der Insulintherapie geschult werden. (American Diabetes Association Professional Practice, Draznin et al. 2022) Die steigende Inzidenz, die häufigen Komplikationen sowie die lebenslang notwendige Therapie des T1D verursachen hohe Kosten. So beliefen sich in einer amerikanischen Studie die Typ I Diabetes-assoziierten Kosten eines Patienten auf 733 bis 780\$ pro Monat. (Simeone, Shah et al. 2020)

Dieser kurze Überblick über den Typ 1 Diabetes zeigt die Relevanz und Aktualität der Erkrankung. Trotz intensiver Forschung in den letzten 100 Jahren, ist es noch nicht gelungen eine kurative Therapie für den T1D zu finden.

Außerdem ist die Pathogenese des T1D noch immer nicht in Gänze verstanden. (DiMeglio, Evans-Molina et al. 2018) Diese Arbeit versucht zum besseren Verständnis der Pathogenese des T1D beizutragen, weswegen ich im Folgenden genauer auf diese eingehen werde.

Die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes ist nicht monokausal, sondern abhängig von einer Vielzahl von verschiedenen Einflussfaktoren, die das Risiko einer Erkrankung jeweils fördern oder senken können. (zusammengefasst in Ilonen, Lempainen et al. 2019)

Studien in monozygoten Zwillingspaaren zeigen, dass die Suszeptibilität für den T1D einem starken genetischen Einfluss unterliegt. (Redondo, Jeffrey et al. 2008) Hierbei haben vor allem verschiedene Polymorphismen in der *Human Leukocyte Antigen* (HLA) Region einen starken Einfluss auf die Krankheits-Suszeptibilität. (Noble, Valdes et al. 1996) Die stärkste Assoziation mit T1D zeigen die Klasse 2 HLA-Moleküle HLA DR und HLA DQ. (Redondo, Steck et al. 2018) T-Zellen erkennen über den T-Zell Rezeptor die von den HLA-Proteinen auf der Zelloberfläche präsentierten Antigene. (Noble 2015) Es wird vermutet, dass die genetischen Polymorphismen die Peptidbindungsstelle der HLA Moleküle verändern und somit die Präsentation der Antigene gegenüber den T-Zellen beeinflussen können. (zusammengefasst in Hu, Deutsch et al. 2015) Bei einer Person, die einen Hoch-Risiko HLA Genotyp aufweist, jedoch keine weiteren Risikofaktoren besitzt, liegt das Risiko für die Entwicklung eines T1D bei nur 6 Prozent (Bonifacio and Ziegler 2010), was die Bedeutsamkeit weiterer Einflussfaktoren unterstreicht. In einer genomweiten Assoziationsstudie und Meta-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Krankheits-Suszeptibilität von über 40 verschiedenen Genloci beeinflusst wird. Unter anderem konnte ein Einfluss des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs6897932 im *IL7RA* Genlokus gezeigt werden. (Barrett, Clayton et al. 2009)

Weitere wichtige Einflussfaktoren auf die Entstehung des T1D sind unter anderem Umweltfaktoren, wie die Ernährung im Kindes- und Jugendalter (Knip, Virtanen et al. 2010), das Mikrobiom im Darm (Wen, Ley et al. 2008) oder verschiedene Virusinfektionen. (zusammengefasst in Ilonen, Lempainen et al.

2019) Bei den viralen Infektionen gibt es sowohl Hinweise auf eine protektive (zum Beispiel durch das Cytomegalievirus) (Ekman, Vuorinen et al. 2019) als auch auf eine risikosteigernde Wirkung (zum Beispiel durch Enteroviren). (Honkanen, Oikarinen et al. 2017)

Der Typ 1 Diabetes entsteht als Folge einer Zerstörung der Insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas durch körpereigene Zellen des Immunsystems. Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems tragen hierbei über verschiedene Mechanismen zur Zerstörung der Pankreasinseln bei. Sowohl bei der Entstehung als auch im weiteren Verlauf der Erkrankung spielen autoreaktive CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen eine entscheidende Rolle. (zusammengefasst in Bluestone, Herold et al. 2010) Bei an Diabetes erkrankten NOD-Mäusen war es möglich, mithilfe eines Anti-CD3 Antikörper eine Krankheitsremission über einen längeren Zeitraum zu erzielen (Chatenoud, Thervet et al. 1994), was die Relevanz der T-Zellen im Krankheitsprozess hervorhebt. Die T-Zellen werden in den Lymphknoten des Pankreas durch die Präsentation von β -Zell Antigenen aktiviert und infiltrieren die Langerhans Inselzellen. (Hoglund, Mintern et al. 1999) Die Infiltration von Immunzellen in die Inselbereiche des Pankreas bezeichnet man als Insulitis. (Gepts 1965) Untersuchungen an Pankreata von T1D Patienten konnten zeigen, dass insbesondere CD8+ T-Zellen, aber auch CD4+ T-Zellen und CD20+ B-Zellen sowie CD68+ Makrophagen charakteristisch für die entzündeten Inselzellen sind. (Willcox, Richardson et al. 2009) Die Schädigung der β -Zellen führt zur Freisetzung von Antigenen, die wiederum zur vermehrten Aktivierung von T-Zellen führt. (Bluestone, Herold et al. 2010) Während CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen also eine Schlüsselrolle in der Entstehung des T1D spielen und Diabetes fördernd wirken, gibt es auch T-Zellen, die protektive Eigenschaften haben. (Lehuen, Diana et al. 2010) Für diese sogenannten regulatorischen T-Zellen konnte im NOD-Modell gezeigt werden, dass sie die Entstehung eines Diabetes verhindern können. (Salomon, Lenschow et al. 2000)

Zusätzlich zur Rolle der T-Zellen ist eine Rolle des angeborenen Immunsystems in der Pathogenese des T1D gut belegt. (zusammengefasst in Diana, Gahzarian et al. 2011) Bei NOD-Mäusen gehören Makrophagen und dendritische Zellen bei der Entstehung der Insulinitis zu den ersten detektierbaren Zellen. (Jansen, Homo-Delarche et al. 1994) Weiterhin konnte in Studien mit NOD-Mäusen gezeigt werden, dass die Entstehung eines Diabetes vermieden werden kann, indem man Makrophagen und T-Zellen an der Infiltration des Pankreas hindert. (Hutchings, Rosen et al. 1990) Im NOD-Modell wurde außerdem gezeigt, dass das Vorhandensein von Makrophagen für die Entwicklung von diabetesinduzierenden T-Zellen notwendig ist. (Jun, Yoon et al. 1999) Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 Beta und Tumornekrosefaktor werden von Makrophagen nach Aktivierung durch Interferon Gamma sezerniert und tragen durch eine Verstärkung der Immunantwort sowie der Expression von reaktiver Sauerstoffspezies zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen des Pankreas bei. (Lehuen, Diana et al. 2010)

1.2 Monozyten

In dieser Arbeit wurden sowohl Monozyten von an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern als auch von gesunden Kontrollpersonen untersucht. Im Folgenden werde ich die Grundeigenschaften dieser Zellen erläutern und auf ihre Funktionen eingehen.

Monozyten sind im Blut zirkulierende Immunzellen und werden zu den weißen Blutkörperchen, den sogenannten Leukozyten gezählt. Innerhalb der Leukozyten machen Monozyten einen Anteil von ungefähr 10% aus und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie sind fähig zur Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokinproduktion und können so wichtige Aufgaben in der Immunantwort übernehmen. Des Weiteren sind sie Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen.

Beim Menschen unterscheidet man verschiedene monozytäre Subpopulationen anhand der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16, die sich auch in ihren Funktionen unterscheiden. (Passlick, Flieger et al. 1989) Monozyten mit einer hohen CD14 Expression (CD14⁺⁺CD16⁻) bezeichnet man als klassische Monozyten (*classical monocytes*), Monozyten mit einer hohen Expression von CD14 und einer Expression von CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺) als intermediäre Monozyten (*intermediate monocytes*) und Monozyten mit einer niedrigen Expression von CD14 und einer hohen Expression von CD16 (CD14⁺CD16⁺⁺) als nicht-klassische/nicht-intermediäre Monozyten (*non-classical monocytes*). (Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al. 2010) CD14 ist ein Glykoprotein mit einer Masse von 55kDa und dient als Ko-Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS). (Wright, Ramos et al. 1990) Als CD16 bezeichnet man den Fc-Gamma-Rezeptor III, welcher an die Fc-Region des Immunglobulin G bindet.

1.2.1 Klassische Monozyten

Unter den oben beschriebenen monozytären Subpopulationen machen klassische Monozyten einen Anteil von 80-90% aus. Unter normalen Bedingungen zirkulieren die klassischen Monozyten für ungefähr einen Tag im Blut bevor sie in verschiedene Gewebe, unter anderem in das Pankreas (Calderon, Carrero et al. 2015), einwandern und dort den Pool von Gewebsmakrophagen auffüllen. (Guilliams, Mildner et al. 2018) Klassische Monozyten können sich außerdem zu intermediären und nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten entwickeln. (Patel, Zhang et al. 2017) Aufgrund der charakteristischen Genexpression von klassischen Monozyten wird ihnen eine Rolle bei der Erkennung von Pathogenen, der Phagozytose sowie der Migration zugeschrieben. (Gren, Rasmussen et al. 2015) Aktivierte klassische Monozyten exprimieren vermehrt pro-inflammatorische Faktoren, sodass eine pro-inflammatorische Rolle der klassischen Monozyten angenommen werden kann. (Thiesen, Janciauskiene et al. 2014)

1.2.2 Intermediäre Monozyten

Intermediäre Monozyten zirkulieren für ungefähr 4 Tage im Blutkreislauf und sind bei manchen chronischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis erhöht. (Cooper, Martin et al. 2012, Patel, Zhang et al. 2017). Intermediäre Monozyten zeichnen sich durch eine starke MHC-II Genexpression aus, was auf eine T-Zell stimulierende Funktion hinweisen könnte. (Wong, Tai et al. 2011) Des Weiteren zeigen intermediäre Monozyten eine Hochregulation von pro-inflammatorischen Genen und unter den monozytären Subpopulationen produzieren sie die größte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies. (Zawada, Rogacev et al. 2011) Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass sie nach Stimulation anti-inflammatorisches IL-10 produzieren (Skrzeczynska-Moncznik, Bzowska et al. 2008), weswegen es weiterer Studien bedarf, um die Mechanismen der pro- oder anti-inflammatorischen Wirkung dieser Zellen zu entschlüsseln. (Kapellos, Bonaguro et al. 2019)

1.2.3 Nicht-klassische/Nicht-intermediäre Monozyten

Mit einer Zirkulationsdauer von ungefähr 7 Tagen verbleiben die nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten am längsten im Blutkreislauf. (Patel, Zhang et al. 2017) Mehrere Studien zeigten, dass diese Monozytensubpopulation im Blut patrouilliert und ihr somit eine Wächterfunktion innerhalb des Gefäßsystems zuteilwird. (zusammengefasst in Narasimhan, Marcovecchio et al. 2019) Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich die nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten zu wundheilungsfördernden, alternativ aktivierten Makrophagen differenzieren können. (Olingy, San Emeterio et al. 2017) Im Vergleich zu den klassischen und intermediären Monozyten produzieren nicht-klassische/nicht-intermediäre Monozyten nach Stimulation geringere Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF α , IL-6, IL-1 Beta). (Boyette, Macedo et al. 2017) Ob alternative Monozyten eine Rolle bei chronischen Erkrankungen spielen, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt (Narasimhan, Marcovecchio et al. 2019) und bedarf weiterer Forschung.

1.2.4 Monozyten und Autoimmunität

Es gibt viele Hinweise auf eine Beteiligung von Monozyten bei der Entstehung von Autoimmunität. Diese kommen unter anderem von Studien über Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, der multiplen Sklerose oder dem systemischen Lupus Erythematoses. (zusammengefasst in Narasimhan, Marcovecchio et al. 2019) Auch zur Rolle der Monozyten beim T1D gibt es bereits erste veröffentlichte Studien. Bei an T1D erkrankten Patienten konnten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe höhere Spiegel von auch von Monozyten produzierten proinflammatorischen Zytokinen im Blut gemessen werden. (Devaraj, Glaser et al. 2006) Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Schwere des T1D mit den im Blut gemessenen TNF α Spiegeln korreliert und Monozyten große Mengen dieses Zytokins produzieren. (zusammengefasst in Ren, Mou et al. 2017) Klassische Monozyten von an T1D erkrankten Patienten sekretierten außerdem proinflammatorische Zytokine wie IL-1 Beta und IL-6, was zur Entwicklung von autoimmunitätsfördernden, IL-17 produzierenden CD4 T-Zellen führt. (Bradshaw, Raddassi et al. 2009) In einer anderen Studie konnte auf klassischen Monozyten von an T1D erkrankten Patienten eine höhere Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 festgestellt werden, was als ein weiterer Hinweis auf einen Beitrag dieser Zellen zur Entstehung von Entzündungsreaktionen gewertet werden kann. (Devaraj, Dasu et al. 2008) Des Weiteren konnten bei an T1D erkrankten Patienten erhöhte Mengen von intermediären Monozyten gefunden werden und eine Assoziation mit einem negativen Outcome konnte festgestellt werden. (Ren, Mou et al. 2017) Die genauen Mechanismen, die hinter der Beteiligung der Monozyten an der Pathogenese des T1D stehen sind jedoch aktuell noch immer nicht in Gänze verstanden und weitere Forschung ist nötig, um diese zu entschlüsseln.

1.3 Interleukin-7 und Interleukin-7 Rezeptor

IL-7 ist ein Zytokin mit einer Masse von 25kDa und ist insbesondere für seine Rolle in der T-Zell Homöostase bekannt. Es wird primär von Thymusstromazellen produziert, aber auch in anderen Geweben wie

Lymphknoten, Haut und Darm konnten IL-7 produzierende Zellen nachgewiesen werden. (zusammengefasst in Kim, Hong et al. 2011) IL-7 vermittelt seine Wirkung durch Bindung an den IL-7R. Dieser Rezeptor wird von verschiedenen Lymphozytenpopulationen exprimiert, jedoch konnten neuere Studien zeigen, dass auch Monozyten u.a. nach Aktivierung durch LPS in der Lage sind, den IL-7R zu exprimieren. (Al-Mossawi, Yager et al. 2019, Adankwah, Harelimana et al. 2021)

1.3.1 Interleukin-7 und Autoimmunität

IL-7 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell Homöostase. Insbesondere naive T-Zellen und T-Gedächtniszellen benötigen IL-7 zum Überleben. (Schluns, Kieper et al. 2000, Seddon, Tomlinson et al. 2003) Defekte im IL-7 Signalweg führen zur Entwicklung von schweren kombinierten Immundefekten (SCID). (Puel, Ziegler et al. 1998) Des Weiteren werden auch eine gesteigerte Expression von IL-7 und des IL-7R mit Erkrankungen des Immunsystems wie dem T1D, der Multiplen Sklerose und der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht. (zusammengefasst in Barata, Durum et al. 2019) Hohe IL-7 Spiegel führen bei regulatorischen T-Zellen (Treg) zum Verlust der Fähigkeit, die Proliferation von naiven T-Zellen nach T-Zell Rezeptorstimulation durch Allo- oder Autoantigene zu verhindern und können so zur Entstehung von autoimmunen T-Zellen beitragen. (Heninger, Theil et al. 2012) Hinweise für eine Beteiligung von IL-7 bei der Pathogenese des T1D kommen unter anderem aus Untersuchungen im NOD-Mausmodell: Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des IL-7R α die Entstehung eines Diabetes verhindern und sogar zu einem Rückgang bei manifester Erkrankung führen kann. (Lee, Logronio et al. 2012) Zusätzlich waren IL-7 Spiegel bei Neugeborenen erhöht und eine höhere Sensitivität von T-Zellen für IL-7 könnte eine Rolle bei der Entstehung von Inselzellautoimmunität spielen. (Heninger, Monti et al. 2013)

1.3.2 Der Interleukin-7 Signalweg

Die Zusammensetzung des IL-7R und dessen Signalweg sind gut untersucht: Der IL-7R ist ein Heterodimer. Er setzt sich aus dem Interleukin-7 Rezeptor Alpha (IL-7R α) und der *common* γ -chain zusammen. (Mazzucchelli and Durum 2007) Der IL-7R α , oder auch CD127, wird im *IL7RA* Gen kodiert und kann sowohl IL-7 als auch *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) binden. Die *common* γ -chain, oder auch CD132, wird im *IL2RG* kodiert und ist Teil der Zytokinrezeptoren für IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 und IL-21. (Barata, Durum et al. 2019) Bindet IL-7 an den IL-7R kommt es zu einer Vernetzung des IL-7R α und der *common* γ -chain. Dies führt dazu, dass sich die intrazellulär gelegenen Januskinasen 1 (JAK1) und 3 (JAK3) gegenseitig phosphorylieren, bis sie letztendlich den IL-7R α phosphorylieren, wodurch eine Andockstelle für weitere Signalmoleküle entsteht. (Barata, Durum et al. 2019) Eines dieser Signalmoleküle ist *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5), welches nach Phosphorylierung an der IL-7R α Kette dimerisiert und dann nach Translokation in den Zellkern die Transkription verschiedener Gene induziert. (Barata, Durum et al. 2019) Zusätzlich zur membranständigen Form existiert eine lösliche Form des IL-7R (sIL-7R α) mit der Fähigkeit IL-7 zu binden. (Goodwin, Friend et al. 1990) Der sIL-7R α entsteht durch alternatives Spleißen und zeichnet sich durch fehlende Sequenzen im Exon 6 des *IL7RA* Gens aus, welche für die Transmembrandomäne des Rezeptors kodieren. (Pleiman, Gimpel et al. 1991) Die Rolle des sIL-7R α ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Lundstrom und Kollegen zeigten, dass der sIL-7R α die Verfügbarkeit von IL-7 *in-vivo* erhöht, indem überschüssiges IL-7 gebunden und somit die Halbwertszeit von IL-7 erhöht wird. Zusätzlich wird der Verbrauch über den mIL-7R α vermindert. Daraus resultiert insgesamt eine verlängerte Exposition der Zellen gegenüber IL-7. (Lundstrom, Highfill et al. 2013) Monti und Kollegen zeigten hingegen, dass der sIL-7R α antagonistisch auf den IL-7 Signalweg wirkt, (Monti, Brigatti et al. 2013) sodass weitere Forschung vonnöten ist um die Rolle des sIL-7R α in Gänze zu verstehen.

1.3.3 Einflüsse genetischer Polymorphismen auf den IL-7R α

Für den IL-7 Signalweg ist insbesondere der IL-7R α von Bedeutung, da durch ihn die nachgeschalteten Signalmoleküle rekrutiert werden. (Hong, Luckey et al. 2012) SNPs im *IL7R* Gen haben einen Einfluss auf die Suszeptibilität von Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose (Gregory, Schmidt et al. 2007), dem systemischen Lupus erythematoses (Wang, Wen et al. 2014) und dem T1D (Todd, Walker et al. 2007). Einige Studien konnten bei Trägern des T-Allels des im Exon 6 des IL7R Gens liegenden SNPs rs6897932 einen protektiven Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zeigen. (zusammengefasst in Lundtoft, Seyfarth et al. 2020) Gregory und Kollegen konnten in einer Studie einen Einfluss des rs6897932 auf das alternative Spleißen und somit auf die Expression des sIL-7R α nachweisen. Hierbei zeigte sich bei Trägern des mit einem erniedrigten Risiko für Autoimmunerkrankungen assoziierten T-Allels (rs6897932T) eine nur halb so hohe Wahrscheinlichkeit für ein Überspringen des Exons 6 als bei Trägern des mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen assoziierten C-Allels (rs6897932C). (Gregory, Schmidt et al. 2007) Bei an T1D erkrankten Patienten wurden jedoch erniedrigte sIL-7R α Spiegel sowohl bei Trägern des protektiven rs6897932T als auch bei Trägern eines risiko-assoziierten SNPs im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. (Seyfarth, Lundtoft et al. 2018) In dieser Studie konnte außerdem keine Korrelation zwischen den IL-7 Spiegeln im Serum und den sIL-7R α Spiegeln gefunden werden. (Seyfarth, Lundtoft et al. 2018) Es wird daher vermutet, dass der SNP-abhängige Einfluss auf die IL-7 Regulation nicht ausschließlich über die sIL-7R α Expression stattfindet, sondern auch andere Mechanismen eine Rolle spielen könnten. (Lundtoft, Seyfarth et al. 2020)

Ein möglicher Mechanismus, der die unterschiedlichen Effekte erklären könnte, wäre ein Einfluss von SNPs auf die Expression des mIL-7R α . (Lundtoft, Seyfarth et al. 2020) Für den durch rs6897932T markierten, protektiven Haplotyp konnte in Experimenten mit Zell-Linien ein positiver Einfluss auf die Expression des mIL-7R α gezeigt werden. (Lundtoft, Seyfarth et al. 2019) Bei Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit T-Zellen konnte jedoch kein Einfluss des

rs6897932T auf die mL-7R α Expression festgestellt werden. (Lundtoft, Seyfarth et al. 2020) Auch eine weitere Studie, die Blutproben von an MS erkrankten Patienten untersuchte, konnte keinen Einfluss des rs6897932T auf die mL-7R α Expression auf T-Zellen zeigen. (Jager, Schulze et al. 2013) In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Al-Mossawi und Kollegen konnte jedoch gezeigt werden, dass der rs6897932T einen Einfluss auf die Expression der löslichen und membranständigen Form des IL-7R α auf Monozyten hat. Der rs6897932T führte zur einer höheren mL-7R α Expression auf mit LPS stimulierten Monozyten und gleichzeitig zu einer niedrigeren sIL-7R α Sekretion. In Übereinstimmung mit früheren Studien wurde auch in dieser Studie kein Einfluss des SNP auf die mL-7R α Expression auf T-Zellen gefunden. (Al-Mossawi, Yager et al. 2019) Diese Studie gibt entscheidende Hinweise auf eine bedeutende Rolle des durch Monozyten exprimierten bzw. sekretierten IL-7R in der IL-7 Regulation und bildet die Grundlage dafür, dass in meiner Arbeit Monozyten mit IL-7 stimuliert und ein besonderes Augenmerk auf die IL-7R Expression gelegt wurde.

1.4 CD40 und CD40-Ligand

Sowohl CD40 als auch sein Bindungspartner, der CD40-Ligand (CD40L), werden mit der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. CD40 ist ein Oberflächenrezeptor, welcher der Gruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren zuzuordnen ist. Der Rezeptor wurde 1985 zunächst auf B-Zellen entdeckt, wird jedoch auch von Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert und ist auf Endothel und Epithelzellen zu finden. (zusammengefasst in van Kooten and Banchereau 2000) Der CD40-Ligand (CD40L) bindet an CD40 und vermittelt so Interaktionen zwischen B- und T-Zellen. (Armitage, Fanslow et al. 1992) Der CD40L wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, unter anderem T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen. (zusammengefasst in Schonbeck and Libby 2001) Die Interaktion zwischen CD40 auf B-Zellen und CD40L auf T-Zellen ist entscheidend für die B-Zellreifung und den T-Zell abhängigen Klassenwechsel

der Immunglobuline. (Kawabe, Naka et al. 1994) Die Bindung von CD40L an CD40 auf Monozyten und dendritischen Zellen führt unter anderem zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit dieser Zellen sowie zu einer erhöhten Produktion von Zytokinen und Enzymen. (van Kooten and Banchereau 2000)

Bei Makrophagen führt der CD40 Signalweg zu pro-inflammatorischen Signalen, welche die Entstehung von Autoimmunerkrankungen fördern könnten. (Karnell, Rieder et al. 2019) Weitere Hinweise auf die Beteiligung des CD40-CD40L Signalwegs bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen kommen von der Beobachtung, dass Lymphozyten von an SLE erkrankten Patienten eine erhöhte CD40L Expression aufweisen, (Desai-Mehta, Lu et al. 1996) und T-Zellen von an T1D erkrankten Patienten CD40 exprimieren. (Waid, Wagner et al. 2007) Außerdem weisen an T1D erkrankte Patienten erhöhte Spiegel von löslichem CD40L auf. (Varo, Vicent et al. 2003) Im NOD-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CD40 vermittelte Signale die Entwicklung von Insulinitis und Diabetes beeinflussen. (Vaitaitis, Waid et al. 2017) Die Entstehung eines Diabetes konnte durch Behandlung mit einem Anti-CD40L Antikörper in der dritten bis vierten Lebenswoche in NOD-Mäusen verhindert werden. (Balasa, Krahl et al. 1997) Die Applikation des Antikörpers bei Mäusen älter als 9 Wochen konnte die Entstehung des Diabetes nicht verhindern, was auf eine Rolle des CD40 Signalwegs insbesondere bei der Initiation der Erkrankung hindeuten könnte. (Balasa, Krahl et al. 1997)

1.5 CD80 und CD86

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, spielen T-Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des T1D. Für die vollständige Aktivierung einer T-Zelle benötigt diese zum einen Signale durch Antigenrezeptoren, zum anderen werden kostimulierende Signale benötigt. CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) sind Oberflächenrezeptoren, die vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden und kostimulierende Signale vermitteln. Sie interagieren mit den auf T-Zellen exprimierten Oberflächenrezeptoren CD28 (Linsley, Brady et al. 1991) und CTLA-4 (CD152). (Linsley, Brady et al. 1991) Über CD28 wird die

Schwelle für die T-Zell Aktivierung herungesetzt und die Aktivierung der T-Zelle erleichtert. (Viola and Lanzavecchia 1996) CTLA-4 vermittelt Signale mit einer inhibierenden Wirkung auf den T-Zell Rezeptor und CD28 Signalweg. (Sharpe and Freeman 2002) Eine Blockade des CTLA-4 Signalwegs führte im Mausmodell zu einer verstärkten Autoimmunität. (Perrin, Maldonado et al. 1996)

In Studien mit NOD-Mäusen, die einen Mangel an CD80 und CD86 aufweisen, konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu den Kontrollmäusen schwerere Diabetesverläufe entwickelten. Zusätzlich konnte ein starker Rückgang der regulatorischen T-Zellen festgestellt werden, was eine Rolle von CD80 und CD86 in der Homöostase der regulatorischen T-Zellen sowie eine Beteiligung bei der Entstehung von Autoimmunität vermuten lässt. (Salomon, Lenschow et al. 2000) Eine erhöhte CD80 Genexpression konnte im Blut von an T1D erkrankten Kindern nachgewiesen werden. (Pruul, Kisand et al. 2013) Monozyten von an T1D erkrankten Patienten exprimierten nach Stimulation mit eigener DNA mehr CD80 und HLA DR als die Kontrollgruppe, was auf eine Überlegenheit in der Fähigkeit zur Ko-Stimulation und Antigenpräsentation hinweisen könnte. (Badal, Dayal et al. 2020)

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Regulation des IL-7R auf Monozyten *in vitro*, sowie die Interleukin-7 vermittelten Effekte auf Monozytensubpopulationen (d.h. auf den Phänotyp und das *in vitro* Überleben) bei Patienten mit Typ 1 Diabetes und Kontrollen zu untersuchen.

1.7 Ethikvotum

Für diese Arbeit liegt ein Ethikvotum mit folgender Referenznummer vor: 2019-423-KFogU

**2 INTERLEUKIN-7-DEPENDENT NONCLASSICAL
MONOCYTES AND CD40 EXPRESSION ARE
AFFECTED IN CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES,
HEHENKAMP, P., HOFFMANN, M., KUMMER, S.,
REINAUER, C., DÖING, C., FÖRTSCH, K.,
ENCZMANN, J., BALZ, V., MAYATEPEK, E.,
MEISSNER, T., JACOBSEN, M., SEYFARTH, J.,
EUR. J. IMMUNOL., 51: 3214-3227. (2021)**

Hehenkamp P, Hoffmann M, Kummer S, Reinauer C, Döing C, Förtsch K, Enczmann J, Balz V, Mayatepek E, Meissner T, Jacobsen M, Seyfarth J. Interleukin-7-dependent nonclassical monocytes and CD40 expression are affected in children with type 1 diabetes. *Eur J Immunol.* 2021 Dec;51(12):3214-3227. doi: 10.1002/eji.202149229. Epub 2021 Nov 1. PMID: 34625948.

3 DISKUSSION

Die hier vorliegende Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) trägt zum besseren Verständnis von IL-7 vermittelten Effekten auf Monozyten bei und gibt Hinweise auf eine mögliche Beteiligung dieser Effekte in der Pathogenese des T1D. Es konnten sowohl allgemeine Effekte von IL-7 auf Monozyten als auch spezifische Unterschiede in der Reaktion auf eine IL-7 Stimulation zwischen Monozyten von gesunden Kontrollen und Monozyten von an T1D erkrankten Kindern aufgezeigt werden. IL-7 führte zu einer niedrigeren mL7Ra Expression, insbesondere auf Monozyten von an T1D erkrankten Kindern. Diese wiesen vor allem auf den CD40 und CD86 hochpositiven Zellen eine verminderte Expression des mL7Ra auf und unterschieden sich in ihrer Reaktion auf IL-7 von den gesunden Kontrollen.

3.1 Die Rolle der Monozytensubpopulationen

3.1.1 Monozytensubpopulationen ex-vivo

In der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) konnte gezeigt werden, dass der Anteil der klassischen Monozyten *ex-vivo* bei den an T1D erkrankten Kindern im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ist, während der Anteil der intermediären Monozyten geringer ist. Interessanterweise beschreiben Ren und Kollegen eine Erhöhung der intermediären Monozyten bei an T1D erkrankten Kindern. (Ren, Mou et al. 2017) Dies mag zunächst im Gegensatz zu dem in der hier vorliegenden Studie gefundenen erniedrigten Anteil der intermediären Monozyten stehen, jedoch wurden in der Studie von Ren und Kollegen sogenannte *new onset* Patienten mit kurzer Krankheitsdauer untersucht (*Mean*: 19,5 Tage) (Ren, Mou et al. 2017), während in der hier vorliegenden Studie Patienten mit längerer Krankheitsdauer eingeschlossen wurden (Median: 5,17 Jahre), was die Vergleichbarkeit erschwert und eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen könnte. Diese Hypothese wird durch

eine Studie von Oras und Kollegen unterstützt, in der die Anzahl der CD16 positiven Monozyten vom Alter abhängig und bei jüngeren T1D Patienten (Alter <11 Jahre) erhöht war. (Oras, Peet et al. 2019) Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil der CD16 positiven Monozyten auch von den C-Peptid Spiegeln und dem Vorhandensein einer Ketoazidose abhängig ist, was eine weitere Erklärung sein könnte. (Oras, Peet et al. 2019) Klassische Monozyten sind bekannt für ihre starken pro-inflammatorischen Eigenschaften und sind in der Lage große Mengen von pro-inflammatorischen Zytokinen zu produzieren. (Wong, Tai et al. 2011, Gren, Rasmussen et al. 2015) In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass klassische Monozyten von an T1D erkrankten Patienten spontan die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 Beta und IL-6 sezernieren und somit die Entwicklung von IL-17 produzierenden CD4 T-Zellen fördern. (Bradshaw, Raddassi et al. 2009) Die erhöhte Anzahl an klassischen Monozyten in der T1D Studiengruppe passt demnach zu den bisher beschriebenen pro-inflammatorischen Eigenschaften dieser Subpopulation und könnte den inflammatorischen Zustand, in dem sich die an T1D erkrankten Kindern befinden, widerspiegeln. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

3.1.2 Einfluss von IL-7 auf die Monozytensubpopulationen und die IL-7R Expression

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Al-Mossawi et al. konnte gezeigt werden, dass der IL-7R von Monozyten exprimiert wird. In dieser Studie wurden Monozyten unter anderem mit LPS stimuliert und es konnte gezeigt werden, dass der mit Autoimmunität assoziierte SNP rs6897932 sowohl die Expression des mL-7R α als auch die des sIL-7R α nach LPS-Stimulation beeinflusst. (Al-Mossawi, Yager et al. 2019) In der hier vorliegenden Studie führte die 24-stündige LPS-Stimulation zu einer deutlichen Zunahme der mL-7R α Expression auf Monozyten (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021), womit dieser Aspekt der Studie von Al-Mossawi repliziert werden konnte. Während Al-Mossawi et al. nur CD14+ Monozyten untersuchten (Al-Mossawi, Yager et al. 2019), konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, dass auch die CD14++CD16+

intermediären und die CD14⁺CD16⁺⁺ nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten den mIL-7R α nach LPS Stimulation exprimieren. (unveröffentlichte Daten) Hierbei muss bemerkt werden, dass sowohl die alleinige *in-vitro* Kultur an sich als auch die Stimulation die Expression von CD14 und CD16 von Monozyten beeinflussten. Auch in einer weiteren von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie konnten ähnliche Kultureffekte auf die CD14 und CD16 Expression von Monozyten beobachtet werden (Adankwah, Harelimana et al. 2021). Um eine sicherere Aussage über die mIL-7R α Expression auf den verschiedenen Monozytensubpopulationen treffen zu können, müsste man demzufolge vorher gesortete Monozyten verwenden. Zusätzlich wurden in der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Monozyten mit IL-7 stimuliert und die mIL-7R α Expression untersucht: Die Stimulation mit IL-7 führte bei Betrachtung beider Studiengruppen im Vergleich zur alleinigen *in-vitro* Kultivierung zu einer Abnahme der mIL-7R α Expression auf Monozyten. Durch den Vergleich von Monozyten von gesunden Kontrollen und von an T1D erkrankten Kindern konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, dass sich die mIL-7R α Expression nach Stimulation mit IL-7 zwischen den Studiengruppen unterscheidet. Monozyten von an T1D erkrankten Kindern wiesen hierbei insgesamt eine niedrigere mIL-7R α Expression auf. Die Expression des membranösen IL-7 Rezeptors wurde bei ihnen durch IL-7 Stimulation vermindert, während dieser Effekt bei den gesunden Kontrollen nicht nachweisbar war. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Monozyten von an T1D erkrankten Kindern und die Monozyten der gesunden Kontrollen eine unterschiedliche Reaktion auf IL-7 aufweisen. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Park und Kollegen konnten in einer Studie demonstrieren, dass T-Zellen den mIL-7R α nach IL-7 Stimulation runterregulieren. (Park, Yu et al. 2004) In neuen, bisher unveröffentlichten Studien unserer Arbeitsgruppe war die Runterregulation des mIL-7R α nach IL-7 Stimulation bei isolierten Monozytenkulturen nicht zu sehen, sodass die in der hier vorliegenden Studie gesehene unterschiedliche Reaktion auf IL-7 zwischen den Studiengruppen zu einem Teil indirekt durch T-Zellen vermittelt sein könnte. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

Durch weitere Analysen der mIL-7R α Expression auf den verschiedenen monozytären Subpopulationen konnte in der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) gezeigt werden, dass sich die mIL-7R α Expression auf diesen zwischen den Studiengruppen unterscheidet: Während sich nach alleiniger *in-vitro* Kultur keine Unterschiede in der mIL-7R α Expression zwischen den Studiengruppen feststellen ließen, führte die Stimulation mit IL-7 zu einer niedrigeren mIL-7R α Expression auf den nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten von an T1D erkrankten Kindern. Bei gemeinsamer Betrachtung der beiden Studiengruppen nahmen die nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten durch IL-7 Stimulation in ihrer Anzahl im Vergleich zu den anderen Subpopulationen am deutlichsten zu. Nach 24-stündiger Stimulation mit IL-7 ließ sich nur eine Zunahme der Proportion der Population der nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten beobachten, wobei bei der 72-stündigen Stimulation mit IL-7 eine Zunahme der absoluten Zellzahlen der nicht-klassischen/nicht-intermediären und klassischen Monozyten sowie eine Abnahme der intermediären Monozyten beobachtet werden konnte. Während für die klassischen Monozyten vor allem pro-inflammatorische Funktionen angenommen werden, (Wong, Tai et al. 2011, Gren, Rasmussen et al. 2015) ist die Rolle der nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten weniger eindeutig und wird eher als anti-inflammatorisch angesehen (Boyette, Macedo et al. 2017). Vor diesem Hintergrund scheint die Vermehrung der nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten durch IL-7 Stimulation zunächst im Gegensatz zu der autoimmunitätsfördernden Wirkung von IL-7 zu stehen. Eine mögliche Erklärung ist, dass IL-7 eine unterschiedliche Wirkung auf Monozyten und T-Zellen haben könnte. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) So konnten Al-Mossawi et. al zeigen, dass der mit Protektion gegen Autoimmunität in Verbindung stehende SNP rs6897932T zu einer höheren mIL-7R α Expression auf Monozyten führt, die Expression des mIL-7R α auf T-Zellen jedoch nicht beeinflusst wird. (Al-Mossawi, Yager et al. 2019). Auch frühere Studien konnten zeigen, dass dieser SNP die Expression des mIL-7R α auf T-Zellen nicht beeinflusst (Jager, Schulze et al. 2013), sodass die Rolle des IL-7R bei der

Entstehung von Autoimmunität Gegenstand aktueller Diskussionen ist. (Lundtoft, Seyfarth et al. 2020) Dazu passt, dass sich die Proportionen der Monozyten Subpopulationen *ex-vivo* und unstimuliert nicht zwischen den Studiengruppen unterscheiden, nach IL-7 Stimulation jedoch die an T1D erkrankten Kinder einen signifikant niedrigeren Anteil an nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten besitzen. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Daraus kann man schließen, dass die oben beschriebene niedrigere mIL-7R α Expression auf den nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten von an T1D erkrankten Kindern zu einer beeinträchtigten Reaktion auf IL-7 führt und somit funktionelle Relevanz besitzen könnte. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

3.2 Einfluss des rs6897932 auf die IL-7R Expression

Wie oben beschrieben beeinflusste in der Studie von Al-Mossawi und Kollegen der SNP rs6897932 die Expression des mIL-7R α auf Monozyten nach LPS Stimulation. (Al-Mossawi, Yager et al. 2019) Ein Einfluss des rs6897932 auf die mIL-7R α Expression auf Monozyten nach LPS Stimulation konnte in meiner Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. (unveröffentlichte Daten) Ein mögliches Problem hierbei könnte die geringe Anzahl an homozygoten Trägern des protektiven T Allels sein, weswegen hierüber keine sichere Aussage getroffen werden kann. Jedoch kann zumindest ein Einfluss des risikofördernden C Allels aufgrund einer höheren Anzahl an homozygoten Probanden mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Zusätzlich zur membranständigen Variante des IL-7R wird ein löslicher IL-7R Rezeptor durch alternatives Spleißen gebildet. (Pleiman, Gimpel et al. 1991) Der Einfluss des rs6897932 auf die Sekretion der löslichen Variante des IL-7R ist gut untersucht und bei Patienten mit T1D, die Träger des protektiven Haplotypen waren, konnten niedrigere Spiegel des sIL-7R α im Serum festgestellt werden. (Seyfarth, Lundtoft et al. 2018) In der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) wurden sowohl die mIL-7R α als auch die sIL-7R α Expression von Monozyten von gesunden Probanden mittels *real-time* qPCR

untersucht, jedoch konnten keine Hinweise auf eine gesteigerte sIL-7R α Expression nach IL-7 Stimulation gefunden werden. Eine veränderte sIL-7R α Expression nach IL-7 Stimulation und somit auch ein Einfluss des rs6897932 erscheint aus diesem Grund unwahrscheinlich. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

3.3 t-SNE-Analysen identifizieren Subpopulation mit distinktem Phänotyp

Um die Einflüsse der veränderten IL-7R Expression weiter zu untersuchen, wurden in der hier vorliegenden Studie, weitere Oberflächenmarker auf Monozyten durchflusszytometrisch untersucht und mittels *t-distributed Stochastic Neighbor-Embedded* (t-SNE) Analyse charakterisiert. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Die t-SNE Analyse ist eine Möglichkeit, mehrdimensionale Daten (in dieser Arbeit die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren auf Monozyten) in einem zweidimensionalen Graphen darzustellen und erleichtert somit die Analyse komplexer Zellphänotypen. Je näher sich zwei Punkte im Graph sind, desto ähnlicher sind sie sich in der Expression der untersuchten Marker und können so als abgrenzbare Cluster dargestellt werden. (van der Maaten 2008) Für die t-SNE Analysen wurden in der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Marker für den mL-7R α , CD40, CD80 und CD86 verwendet. Während sich bei der gemeinsamen Betrachtung beider Studiengruppen für die 24-stündige *in-vitro* Kultur und die 24-stündige Stimulation mit LPS jeweils ein Cluster von Zellen mit einer hohen mL-7R α Expression bildete, zeigten sich interessanterweise nach 24-stündiger Stimulation mit IL-7 drei eindeutig voneinander abgrenzbare Zellcluster. Dies deutet daraufhin, dass nach IL-7 Stimulation drei phänotypisch unterschiedliche Zellpopulationen eine hohe IL-7R Expression aufweisen. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Während LPS zu einer erhöhten CD80 und einer verminderten CD86 Expression auf Monozyten führte, verminderte IL-7 signifikant die CD80 Expression und zeigte einen Trend zu einer erhöhten CD86 Expression auf Monozyten. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

Hervorzuheben ist, dass die IL-7 Stimulation einen Einfluss auf die CD40 Expression auf Monozyten hatte, während eine Stimulation mit LPS zu keiner signifikanten Veränderung führte. Hierbei wurde CD40 auf den untersuchten Monozyten durch die Stimulation mit IL-7 deutlich hochreguliert. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Van Roon und Kollegen konnten in einer Studie zeigen, dass für die IL-7 abhängige *in-vitro* Aktivierung und Proliferation von CD14+ Monozyten die gleichzeitige Präsenz von CD4+ T-Zellen vonnöten ist (van Roon, Verweij et al. 2005), sodass davon auszugehen ist, dass T-Zell-Monozyten-Interaktionen oder T-Zell Zytokine für die Hoch- und Runterregulation der oben beschriebenen Marker eine Rolle spielen. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

CD40 ist ein Oberflächenrezeptor, der unter anderem auf Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird und gemeinsam mit dem CD40L die Interaktion zwischen T- und B-Zellen vermittelt. (zusammengefasst in van Kooten and Banchereau 2000) Hinweise auf eine Beteiligung von CD40 bei der Entstehung des T1D kommen von Studien mit NOD-Mäusen, bei denen CD40 vermittelte Signale zur Entwicklung eines Diabetes notwendig waren und die Entstehung eines Diabetes durch Blockade mit einem Anti-CD40L Antikörper verhindert werden konnte. (Balasa, Krahl et al. 1997) In der hier vorliegenden Studie zeigten Monozyten von an T1D erkrankten Kindern sowohl *ex-vivo* als auch nach *in-vitro* Kultur mit oder ohne LPS eine niedrigere Expression von CD40. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Dies kann als kontrovers angesehen werden, jedoch wurden die diabetogenen Eigenschaften von CD40 positiven Zellen bisher insbesondere für die T-Zellen gezeigt (Vaitaitis, Waid et al. 2017), während über die Rolle von CD40 positiven Monozyten bei der Pathogenese des T1D bisher wenig bekannt ist. Nach IL-7 Stimulation ließen sich die in der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) gefundenen Unterschiede nicht mehr feststellen. Durch Untersuchung der mit IL-7 stimulierten Monozyten mit einer starken CD40 Expression (*CD40high*) und einer niedrigen CD40 Expression (*CD40low*) wurde deutlich, dass sich die Monozyten von den gesunden Kontrollen und den an T1D erkrankten Kindern insbesondere in ihrer mL-7Ra Expression auf den *CD40high* Monozyten

unterschieden haben. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Monozyten von an T1D erkrankten Kindern wiesen hierbei eine niedrigere Expression des mIL-7R α auf. Dies steht im Einklang mit den weiter oben beschriebenen Ergebnissen, dass die nicht-klassischen/nicht-intermediären Monozyten von an T1D erkrankten Kindern eine niedrigere IL-7R Expression aufwiesen als die der gesunden Kontrollen und kann als ein weiterer Hinweis auf eine protektive Rolle von IL-7 vermittelten Monozytenfunktionen gewertet werden. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Hier wäre eine Untersuchung der Effekte auf die monozytären Subpopulationen sicherlich interessant gewesen. Für die dafür benötigte vorangehende Zellsortierung stand jedoch nicht genügend Zellmaterial zur Verfügung, sodass dies Gegenstand zukünftiger Studien sein könnte. Einen weiteren Hinweis für Unterschiede der Monozyten der verschiedenen Studiengruppen in der IL-7 Antwort gibt außerdem die Korrelation der mIL-7R α Expression mit der CD40 Expression. Während diese bei den Monozyten der gesunden Kontrollen positiv korreliert waren, zeigte sich bei den Monozyten der an T1D erkrankten Probanden eine negative Korrelation. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

Weiterführende t-SNE-Analysen der Monozyten, aufgeteilt nach Studiengruppen, lieferten weitere Hinweise auf eine unterschiedliche IL-7 Antwort der Monozyten von an T1D erkrankten Kindern und denen der gesunden Kontrollen: Bei beiden Studiengruppen konnte nach IL-7 Stimulation zwischen drei verschiedenen hochpositiven Clustern von *CD40^{high}* Monozyten anhand der CD86 Expression (hoch, mittel, niedrig) unterschieden werden. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Während sich bei den Monozyten der Kontrollen eine hohe mIL-7R α Expression auf den *CD40^{high}* und CD86 hochpositiven Monozyten nachweisen ließ, ließ sich bei den Monozyten der an T1D erkrankten Kindern keine erhöhte mIL-7R α Expression nachweisen. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Dies deutet darauf hin, dass die Monozyten mit einer hohen CD40 und CD86 Expression bei an T1D erkrankten Probanden in ihrer Funktion eingeschränkt sind und eine mögliche Rolle in der Pathogenese des T1D spielen könnten. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Bemerkenswerterweise gibt es viele Hinweise auf eine mögliche Beteiligung

von CD40 und CD86 bei der Pathogenese des T1D. (Balasa, Krahl et al. 1997, Salomon, Lenschow et al. 2000, Vaitaitis, Waid et al. 2017) Dass Monozyten von an T1D erkrankten Kindern mit einer hohen Expression dieser Marker nach IL-7 Stimulation eine verminderte mL-7R α Expression aufweisen, unterstützt die oben vermutete Beteiligung dieser Zellen bei der Pathogenese des T1D und unterstreicht die Relevanz der Beobachtung. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021)

3.4 Bedeutung für neue Therapieansätze

Trotz jahrelanger intensiver Forschung konnte bisher keine kausale Therapie des T1D gefunden werden. Obwohl sich die Therapie der Erkrankung stetig weiterentwickelt, leiden Betroffene unter vielfältigen Komplikationen die unter anderem die Nieren, das Nervensystem und die Haut betreffen. (zusammengefasst in Papatheodorou, Banach et al. 2015) Eine kausale Therapie könnte im besten Fall die Entstehung der Krankheit verhindern bzw. rückgängig machen und somit diese Komplikationen verhindern. Neue Erkenntnisse in der Pathogenese des T1D helfen, mögliche Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien zu identifizieren und dem Ziel einer kausalen Therapie näher zu kommen. In meiner Arbeit konnten Unterschiede zwischen den Monozyten von an T1D erkrankten Kindern und denen der gesunden Kontrollen in der Antwort auf eine Stimulation mit IL-7 gezeigt werden. Nach IL-7 Stimulation wiesen Monozyten von an T1D erkrankten Kindern mit einer hohen Expression von CD40 und CD86 eine niedrige mL-7R α Expression auf. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Der IL-7 Signalweg und mögliche therapeutische Ansatzpunkte sind Gegenstand intensiver Forschung und im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des IL-7R mit einem Antikörper die Entstehung des Diabetes rückgängig machen konnte. (Lee, Logronio et al. 2012) Insgesamt fokussieren sich die bisherigen therapeutischen Ansätze beim IL-7 Signalweg hauptsächlich auf eine Blockade des Rezeptors. (Markovic and Savvides 2020) Hierbei belaufen sich die Erfolge der Medikamente, die in den IL-7 Signalweg beim T1D eingreifen jedoch bisher nur

auf laufende oder abgeschlossene Phase 1 Studien. (Ellis, van Maurik et al. 2019, Herold, Bucktrout et al. 2019, zusammengefasst in Markovic and Savvides 2020) Zudem fokussieren sich die meisten pharmakologischen Studien beim T1D auf die T- und B-Zell Antwort und vernachlässigen hierbei die Effekte auf die angeborene Immunantwort. (Warshauer, Bluestone et al. 2020) Die in der hier vorliegenden Studie gefundene niedrigere mIL-7Ra Expression auf Monozyten von an T1D erkrankten Kindern im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Behandlung mit einem Anti-IL7R Antikörper nicht nur positiven Einfluss auf die Entwicklung des T1D nimmt, sondern auch eventuelle protektive Einflüsse des IL-7R auf Monozyten blockieren kann. Um die Hintergründe und die verschiedenen Wirkungen des IL-7 Signalwegs und einer potenziellen Blockade zu verstehen, ist es somit wichtig, diesen in verschiedenen Krankheiten und weiterführenden Studien zu untersuchen. Außerdem wäre es von Interesse herauszufinden, ob ein therapeutischer Ansatz an Zellen des angeborenen Immunsystems eine Möglichkeit darstellen könnte.

3.5 Stärken und Schwächen der Arbeit

Nachdem ich die in meiner Arbeit gefundenen Ergebnisse oben bereits diskutiert habe, möchte ich im Folgenden noch einmal explizit auf die Stärken und Schwächen meiner Arbeit eingehen. Eine Stärke der Arbeit ist die Inklusion einer großen Anzahl an Oberflächenmarkern, die zum einen die Unterteilung in die verschiedenen Monozytensubpopulationen und zum anderen eine genaue Phänotypisierung anhand mehrerer Oberflächenmarker (CD40, CD80, CD86, mIL7Ra) ermöglicht. Außerdem konnte eine ausreichend große Menge an Probanden untersucht werden, sodass die gefundenen Ergebnisse aussagekräftig sind. Eine Stärke der Arbeit sind sicherlich auch die t-SNE-Analysen, die geholfen haben, die große Menge an Daten anschaulich darzustellen und zu analysieren. Zu erwähnen ist, dass in der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) *peripheral blood mononuclear cells*

(PBMCs) von gesunden Kontrollen und an T1D erkrankten Kindern als Zellmaterial verwendet wurden. Die darin enthaltenen Monozyten wurden durch *Gating* anhand ihrer Lage im *Scatter* und der Expression von CD11b, HLADR, CD14 und CD16 identifiziert. Durch die gemeinsame Kultur mit den anderen Immunzellsubtypen konnten Interaktionen mit anderen Zellarten und somit indirekt vermittelte Effekte nicht ausgeschlossen werden, sodass man dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigen muss. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) So könnte es sein, dass sowohl die beobachtete IL-7R α als auch die CD40 Expression der Monozyten auf von zum Beispiel T-Zellen ausgeschütteten Zytokine zurückzuführen sind. (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) Die hohen benötigten Zellzahlen für eine Isolation von Monozyten und die limitierte Anzahl an zur Verfügung stehenden Proben verhinderten in der hier vorliegenden Studie die Verwendung von isolierten oder vorher gesorteten Monozyten. Obwohl in der hier vorliegenden Studie viele Hinweise auf eine funktionelle Relevanz der gefundenen Ergebnisse aufgezeigt werden konnten, werden weitere Studien benötigt, um diese zu bestätigen und die genauen Mechanismen besser zu untersuchen.

3.6 Ausblick

In zukünftigen Studien soll die funktionelle Relevanz der gefundenen Ergebnisse für die Pathogenese des T1D weiter untersucht werden. Hierfür bieten sich Studien mit Zell-Linien, Tier-basierte Versuche aber auch weitere Studien mit humanen Monozyten von gesunden Kontrollen und von an T1D erkrankten Kindern an. Da insbesondere Kultur- und Stimulationseffekte in der hier vorliegenden Studie (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021) bei der Untersuchung der monozytären Subpopulationen nicht ausgeschlossen und quantifiziert werden konnten, wäre es in weiteren Studien von Interesse die verschiedenen Subpopulationen mithilfe von vorheriger Zellsortierung zu trennen und separat zu untersuchen. Auch der Einfluss des mit Protektion gegen Autoimmunität verbundenen SNP rs6897932 sollte in Studien mit einer

größeren Anzahl von Trägern des protektiven T-Allels untersucht werden, um mehr Licht auf die der Protektion zugrundeliegenden Mechanismen zu werfen.

4 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Adankwah, E., J. D. Harelimana, D. Minadzi, W. Aniagyei, M. K. Abass, L. Batsa Debrah, D. O. Owusu, E. Mayatepek, R. O. Phillips and M. Jacobsen (2021). "Lower IL-7 Receptor Expression of Monocytes Impairs Antimycobacterial Effector Functions in Patients with Tuberculosis." *J Immunol* **206**(10): 2430-2440.
- Al-Mossawi, H., N. Yager, C. A. Taylor, E. Lau, S. Danielli, J. de Wit, J. Gilchrist, I. Nassiri, E. A. Mahe, W. Lee, L. Rizvi, S. Makino, J. Cheeseman, M. Neville, J. C. Knight, P. Bowness and B. P. Fairfax (2019). "Context-specific regulation of surface and soluble IL7R expression by an autoimmune risk allele." *Nat Commun* **10**(1): 4575.
- American Diabetes Association Professional Practice, C. (2022). "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022." *Diabetes Care* **45**(Suppl 1): S17-S38.
- American Diabetes Association Professional Practice, C., B. Draznin, V. R. Aroda, G. Bakris, G. Benson, F. M. Brown, R. Freeman, J. Green, E. Huang, D. Isaacs, S. Kahan, J. Leon, S. K. Lyons, A. L. Peters, P. Prahalad, J. E. B. Reusch and D. Young-Hyman (2022). "9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2022." *Diabetes Care* **45**(Suppl 1): S125-S143.
- Armitage, R. J., W. C. Fanslow, L. Strockbine, T. A. Sato, K. N. Clifford, B. M. Macduff, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. Davis-Smith, C. R. Maliszewski and et al. (1992). "Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40." *Nature* **357**(6373): 80-82.
- Badal, D., D. Dayal, G. Singh and N. Sachdeva (2020). "Role of DNA-LL37 complexes in the activation of plasmacytoid dendritic cells and monocytes in subjects with type 1 diabetes." *Sci Rep* **10**(1): 8896.
- Balasa, B., T. Krahl, G. Patstone, J. Lee, R. Tisch, H. O. McDevitt and N. Sarvetnick (1997). "CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice." *J Immunol* **159**(9): 4620-4627.
- Barata, J. T., S. K. Durum and B. Seddon (2019). "Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease." *Nat Immunol* **20**(12): 1584-1593.
- Barrett, J. C., D. G. Clayton, P. Concannon, B. Akolkar, J. D. Cooper, H. A. Erlich, C. Julier, G. Morahan, J. Nerup, C. Nierras, V. Plagnol, F. Pociot, H. Schuilenburg, D. J. Smyth, H. Stevens, J. A. Todd, N. M. Walker, S. S. Rich and C. Type 1 Diabetes Genetics (2009). "Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes." *Nat Genet* **41**(6): 703-707.
- Bluestone, J. A., K. Herold and G. Eisenbarth (2010). "Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes." *Nature* **464**(7293): 1293-1300.
- Bonifacio, E. and A. G. Ziegler (2010). "Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes." *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**(3): 513-525.
- Boyette, L. B., C. Macedo, K. Hadi, B. D. Elinoff, J. T. Walters, B. Ramaswami, G. Chalasani, J. M. Taboas, F. G. Lakkis and D. M. Metes (2017). "Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets." *PLoS One* **12**(4): e0176460.
- Bradshaw, E. M., K. Raddassi, W. Elyaman, T. Orban, P. A. Gottlieb, S. C. Kent and D. A. Hafler (2009). "Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells." *J Immunol* **183**(7): 4432-4439.
- Calderon, B., J. A. Carrero, S. T. Ferris, D. K. Sojka, L. Moore, S. Epelman, K. M. Murphy, W. M. Yokoyama, G. J. Randolph and E. R. Unanue (2015). "The pancreas

anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages." J Exp Med **212**(10): 1497-1512.

Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo and J. F. Bach (1994). "Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 123-127.

Cooper, D. L., S. G. Martin, J. I. Robinson, S. L. Mackie, C. J. Charles, J. Nam, Y. Consortium, J. D. Isaacs, P. Emery and A. W. Morgan (2012). "FcγRIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy." PLoS One **7**(1): e28918.

Desai-Mehta, A., L. Lu, R. Ramsey-Goldman and S. K. Datta (1996). "Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production." J Clin Invest **97**(9): 2063-2073.

Devaraj, S., M. R. Dasu, J. Rockwood, W. Winter, S. C. Griffen and I. Jialal (2008). "Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state." J Clin Endocrinol Metab **93**(2): 578-583.

Devaraj, S., N. Glaser, S. Griffen, J. Wang-Polagruto, E. Miguelino and I. Jialal (2006). "Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes." Diabetes **55**(3): 774-779.

Diana, J., L. Gahzarian, Y. Simoni and A. Lehuen (2011). "Innate immunity in type 1 diabetes." Discov Med **11**(61): 513-520.

DiMeglio, L. A., C. Evans-Molina and R. A. Oram (2018). "Type 1 diabetes." Lancet **391**(10138): 2449-2462.

Ekman, I., T. Vuorinen, M. Knip, R. Veijola, J. Toppari, H. Hyoty, T. Kinnunen, J. Ilonen and J. Lempainen (2019). "Early childhood CMV infection may decelerate the progression to clinical type 1 diabetes." Pediatr Diabetes **20**(1): 73-77.

Ellis, J., A. van Maurik, L. Fortunato, S. Gisbert, K. Chen, A. Schwartz, S. McHugh, A. Want, S. Santos Franco, J. J. Oliveira, J. Price, A. Coles, K. Brown, D. Su, J. L. Craigen, J. Yang, S. Brett, B. Davis, J. Cheriyan, O. Kousin-Ezewu, F. Gray, P. W. Thompson and D. Fernando (2019). "Anti-IL-7 receptor alpha monoclonal antibody (GSK2618960) in healthy subjects - a randomized, double-blind, placebo-controlled study." Br J Clin Pharmacol **85**(2): 304-315.

Gepts, W. (1965). "Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus." Diabetes **14**(10): 619-633.

Goodwin, R. G., D. Friend, S. F. Ziegler, R. Jerzy, B. A. Falk, S. Gimpel, D. Cosman, S. K. Dower, C. J. March, A. E. Namen and et al. (1990). "Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily." Cell **60**(6): 941-951.

Gregory, S. G., S. Schmidt, P. Seth, J. R. Oksenberg, J. Hart, A. Prokop, S. J. Caillier, M. Ban, A. Goris, L. F. Barcellos, R. Lincoln, J. L. McCauley, S. J. Sawcer, D. A. Compston, B. Dubois, S. L. Hauser, M. A. Garcia-Blanco, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines and G. Multiple Sclerosis Genetics (2007). "Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis." Nat Genet **39**(9): 1083-1091.

Gren, S. T., T. B. Rasmussen, S. Janciauskiene, K. Hakansson, J. G. Gerwien and O. Grip (2015). "A Single-Cell Gene-Expression Profile Reveals Inter-Cellular Heterogeneity within Human Monocyte Subsets." PLoS One **10**(12): e0144351.

Group, D. P. (2006). "Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999." Diabet Med **23**(8): 857-866.

Guilliams, M., A. Mildner and S. Yona (2018). "Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes." *Immunity* **49**(4): 595-613.

Hehenkamp, P., M. Hoffmann, S. Kummer, C. Reinauer, C. Doing, K. Fortsch, J. Enczmann, V. Balz, E. Mayatepek, T. Meissner, M. Jacobsen and J. Seyfarth (2021). "Interleukin-7-dependent nonclassical monocytes and CD40 expression are affected in children with type 1 diabetes." *Eur J Immunol*.

Heninger, A. K., P. Monti, C. Wilhelm, P. Schwaiger, D. Kuehn, A. G. Ziegler and E. Bonifacio (2013). "Activation of islet autoreactive naive T cells in infants is influenced by homeostatic mechanisms and antigen-presenting capacity." *Diabetes* **62**(6): 2059-2066.

Heninger, A. K., A. Theil, C. Wilhelm, C. Petzold, N. Huebel, K. Kretschmer, E. Bonifacio and P. Monti (2012). "IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells." *J Immunol* **189**(12): 5649-5658.

Herold, K. C., S. L. Bucktrout, X. Wang, B. W. Bode, S. E. Gitelman, P. A. Gottlieb, J. Hughes, T. Joh, J. B. McGill, J. H. Pettus, S. Potluri, D. Schatz, M. Shannon, C. Udata, G. Wong, M. Levisetti, B. J. Ganguly, P. D. Garzone and R. N. W. Group (2019). "Immunomodulatory activity of humanized anti-IL-7R monoclonal antibody RN168 in subjects with type 1 diabetes." *JCI Insight* **4**(24).

Hoglund, P., J. Mintern, C. Waltzinger, W. Heath, C. Benoist and D. Mathis (1999). "Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes." *J Exp Med* **189**(2): 331-339.

Hong, C., M. A. Luckey and J. H. Park (2012). "Intrathymic IL-7: the where, when, and why of IL-7 signaling during T cell development." *Semin Immunol* **24**(3): 151-158.

Honkanen, H., S. Oikarinen, N. Nurminen, O. H. Laitinen, H. Huhtala, J. Lehtonen, T. Ruokoranta, M. M. Hankaniemi, V. Lecouturier, J. W. Almond, S. Tauriainen, O. Simell, J. Ilonen, R. Veijola, H. Viskari, M. Knip and H. Hyoty (2017). "Detection of enteroviruses in stools precedes islet autoimmunity by several months: possible evidence for slowly operating mechanisms in virus-induced autoimmunity." *Diabetologia* **60**(3): 424-431.

Hu, X., A. J. Deutsch, T. L. Lenz, S. Onengut-Gumuscu, B. Han, W. M. Chen, J. M. Howson, J. A. Todd, P. I. de Bakker, S. S. Rich and S. Raychaudhuri (2015). "Additive and interaction effects at three amino acid positions in HLA-DQ and HLA-DR molecules drive type 1 diabetes risk." *Nat Genet* **47**(8): 898-905.

Hutchings, P., H. Rosen, L. O'Reilly, E. Simpson, S. Gordon and A. Cooke (1990). "Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages." *Nature* **348**(6302): 639-642.

Ilonen, J., J. Lempainen and R. Veijola (2019). "The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus." *Nat Rev Endocrinol* **15**(11): 635-650.

Jager, J., C. Schulze, S. Rosner and R. Martin (2013). "IL7RA haplotype-associated alterations in cellular immune function and gene expression patterns in multiple sclerosis." *Genes Immun* **14**(7): 453-461.

Jansen, A., F. Homo-Delarche, H. Hooijkaas, P. J. Leenen, M. Dardenne and H. A. Drexhage (1994). "Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice." *Diabetes* **43**(5): 667-675.

Jensen, E. T., J. M. Stafford, S. Saydah, R. B. D'Agostino, L. M. Dolan, J. M. Lawrence, S. Marcovina, E. J. Mayer-Davis, C. Pihoker, A. Rewers and D. Dabelea (2021). "Increase in Prevalence of Diabetic Ketoacidosis at Diagnosis Among Youth

With Type 1 Diabetes: The SEARCH for Diabetes in Youth Study." Diabetes Care **44**(7): 1573-1578.

Jun, H. S., C. S. Yoon, L. Zbytniuk, N. van Rooijen and J. W. Yoon (1999). "The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." J Exp Med **189**(2): 347-358.

Kapellos, T. S., L. Bonaguro, I. Gemund, N. Reusch, A. Saglam, E. R. Hinkley and J. L. Schultze (2019). "Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases." Front Immunol **10**: 2035.

Karnell, J. L., S. A. Rieder, R. Ettinger and R. Kolbeck (2019). "Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond." Adv Drug Deliv Rev **141**: 92-103.

Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto and H. Kikutani (1994). "The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation." Immunity **1**(3): 167-178.

Kim, G. Y., C. Hong and J. H. Park (2011). "Seeing is believing: illuminating the source of in vivo interleukin-7." Immune Netw **11**(1): 1-10.

Knip, M., S. M. Virtanen and H. K. Akerblom (2010). "Infant feeding and the risk of type 1 diabetes." Am J Clin Nutr **91**(5): 1506S-1513S.

Lee, L. F., K. Logronio, G. H. Tu, W. Zhai, I. Ni, L. Mei, J. Dilley, J. Yu, A. Rajpal, C. Brown, C. Appah, S. M. Chin, B. Han, T. Affolter and J. C. Lin (2012). "Anti-IL-7 receptor-alpha reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(31): 12674-12679.

Lehuen, A., J. Diana, P. Zaccane and A. Cooke (2010). "Immune cell crosstalk in type 1 diabetes." Nat Rev Immunol **10**(7): 501-513.

Linsley, P. S., W. Brady, L. Grosmaire, A. Aruffo, N. K. Damle and J. A. Ledbetter (1991). "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation." J Exp Med **173**(3): 721-730.

Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle and J. A. Ledbetter (1991). "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." J Exp Med **174**(3): 561-569.

Lundstrom, W., S. Highfill, S. T. Walsh, S. Beq, E. Morse, I. Kockum, L. Alfredsson, T. Olsson, J. Hillert and C. L. Mackall (2013). "Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(19): E1761-1770.

Lundtoft, C., J. Seyfarth and M. Jacobsen (2020). "IL7RA genetic variants differentially affect IL-7Ralpha expression and alternative splicing: a role in autoimmune and infectious diseases?" Genes Immun **21**(2): 83-90.

Lundtoft, C., J. Seyfarth, S. Oberstrass, J. Rosenbauer, C. Baechle, M. Roden, R. W. Holl, E. Mayatepek, S. Kummer, T. Meissner and M. Jacobsen (2019). "Autoimmunity risk- and protection-associated IL7RA genetic variants differentially affect soluble and membrane IL-7Ralpha expression." J Autoimmun **97**: 40-47.

Maahs, D. M., N. A. West, J. M. Lawrence and E. J. Mayer-Davis (2010). "Epidemiology of type 1 diabetes." Endocrinol Metab Clin North Am **39**(3): 481-497.

Markovic, I. and S. N. Savvides (2020). "Modulation of Signaling Mediated by TSLP and IL-7 in Inflammation, Autoimmune Diseases, and Cancer." Front Immunol **11**: 1557.

Mazzucchelli, R. and S. K. Durum (2007). "Interleukin-7 receptor expression: intelligent design." Nat Rev Immunol **7**(2): 144-154.

McLaughlin, K. A., C. C. Richardson, A. Ravishankar, C. Brigatti, D. Liberati, V. Lampasona, L. Piemonti, D. Morgan, R. G. Feltbower and M. R. Christie (2016). "Identification of Tetraspanin-7 as a Target of Autoantibodies in Type 1 Diabetes." Diabetes **65**(6): 1690-1698.

Monti, P., C. Brigatti, M. Krasmann, A. G. Ziegler and E. Bonifacio (2013). "Concentration and activity of the soluble form of the interleukin-7 receptor alpha in type 1 diabetes identifies an interplay between hyperglycemia and immune function." Diabetes **62**(7): 2500-2508.

Narasimhan, P. B., P. Marcovecchio, A. A. J. Hamers and C. C. Hedrick (2019). "Nonclassical Monocytes in Health and Disease." Annu Rev Immunol **37**: 439-456.

Noble, J. A. (2015). "Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review." J Autoimmun **64**: 101-112.

Noble, J. A., A. M. Valdes, M. Cook, W. Klitz, G. Thomson and H. A. Erlich (1996). "The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families." Am J Hum Genet **59**(5): 1134-1148.

Olingy, C. E., C. L. San Emeterio, M. E. Ogle, J. R. Krieger, A. C. Bruce, D. D. Pfau, B. T. Jordan, S. M. Peirce and E. A. Botchwey (2017). "Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury." Sci Rep **7**(1): 447.

Oras, A., A. Peet, T. Giese, V. Tillmann and R. Uibo (2019). "A study of 51 subtypes of peripheral blood immune cells in newly diagnosed young type 1 diabetes patients." Clin Exp Immunol **198**(1): 57-70.

Papatheodorou, K., M. Banach, M. Edmonds, N. Papanas and D. Papazoglou (2015). "Complications of Diabetes." J Diabetes Res **2015**: 189525.

Park, J. H., Q. Yu, B. Erman, J. S. Appelbaum, D. Montoya-Durango, H. L. Grimes and A. Singer (2004). "Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival." Immunity **21**(2): 289-302.

Passlick, B., D. Flieger and H. W. Ziegler-Heitbrock (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." Blood **74**(7): 2527-2534.

Patel, A. A., Y. Zhang, J. N. Fullerton, L. Boelen, A. Rongvaux, A. A. Maini, V. Bigley, R. A. Flavell, D. W. Gilroy, B. Asquith, D. Macallan and S. Yona (2017). "The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation." J Exp Med **214**(7): 1913-1923.

Patterson, C. C., S. Karuranga, P. Salpea, P. Saeedi, G. Dahlquist, G. Soltesz and G. D. Ogle (2019). "Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition." Diabetes Res Clin Pract **157**: 107842.

Perrin, P. J., J. H. Maldonado, T. A. Davis, C. H. June and M. K. Racke (1996). "CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis." J Immunol **157**(4): 1333-1336.

Pleiman, C. M., S. D. Gimpel, L. S. Park, H. Harada, T. Taniguchi and S. F. Ziegler (1991). "Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter." Mol Cell Biol **11**(6): 3052-3059.

Pruul, K., K. Kisand, K. Alnek, K. Metskula, K. Heilman, A. Peet, K. Varik and R. Uibo (2013). "Expression of B7 and CD28 family genes in newly diagnosed type 1 diabetes." Hum Immunol **74**(10): 1251-1257.

Puel, A., S. F. Ziegler, R. H. Buckley and W. J. Leonard (1998). "Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency." Nat Genet **20**(4): 394-397.

Redondo, M. J., J. Jeffrey, P. R. Fain, G. S. Eisenbarth and T. Orban (2008). "Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins." N Engl J Med **359**(26): 2849-2850.

Redondo, M. J., A. K. Steck and A. Pugliese (2018). "Genetics of type 1 diabetes." Pediatr Diabetes **19**(3): 346-353.

Ren, X., W. Mou, C. Su, X. Chen, H. Zhang, B. Cao, X. Li, D. Wu, X. Ni, J. Gui and C. Gong (2017). "Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children." Int J Biol Sci **13**(2): 209-218.

Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." Immunity **12**(4): 431-440.

Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson and L. Lefrancois (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." Nat Immunol **1**(5): 426-432.

Schonbeck, U. and P. Libby (2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad." Cell Mol Life Sci **58**(1): 4-43.

Seddon, B., P. Tomlinson and R. Zamoyska (2003). "Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells." Nat Immunol **4**(7): 680-686.

Seyfarth, J., C. Lundtoft, K. Fortsch, H. Ahlert, J. Rosenbauer, C. Baechle, M. Roden, R. W. Holl, E. Mayatepek, S. Kummer, T. Meissner and M. Jacobsen (2018). "Interleukin-7 receptor alpha-chain haplotypes differentially affect soluble IL-7 receptor and IL-7 serum concentrations in children with type 1 diabetes." Pediatr Diabetes **19**(5): 955-962.

Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol **2**(2): 116-126.

Simeone, J. C., S. Shah, M. L. Ganz, S. Sullivan, A. Korolova, J. LeGrand and J. Bushman (2020). "Healthcare resource utilization and cost among patients with type 1 diabetes in the United States." J Manag Care Spec Pharm **26**(11): 1399-1410.

Skrzeczynska-Moncznik, J., M. Bzowska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala and J. Pryjma (2008). "Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10." Scand J Immunol **67**(2): 152-159.

Thiesen, S., S. Janciauskiene, H. Uronen-Hansson, W. Agace, C. M. Hogerkorp, P. Spee, K. Hakansson and O. Grip (2014). "CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease." J Leukoc Biol **95**(3): 531-541.

Todd, J. A., N. M. Walker, J. D. Cooper, D. J. Smyth, K. Downes, V. Plagnol, R. Bailey, S. Nejentsev, S. F. Field, F. Payne, C. E. Lowe, J. S. Szeszko, J. P. Hafler, L. Zeitels, J. H. Yang, A. Vella, S. Nutland, H. E. Stevens, H. Schuilenburg, G. Coleman, M. Maisuria, W. Meadows, L. J. Smink, B. Healy, O. S. Burren, A. A. Lam, N. R. Ovington, J. Allen, E. Adlem, H. T. Leung, C. Wallace, J. M. Howson, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, F. Genetics of Type 1 Diabetes in, M. J. Simmonds, J. M. Heward, S. C. Gough, C. Wellcome Trust Case Control, D. B. Dunger, L. S. Wicker and D. G. Clayton (2007). "Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes." Nat Genet **39**(7): 857-864.

Vaitaitis, G. M., D. M. Waid, M. G. Yussman and D. H. Wagner, Jr. (2017). "CD40-mediated signalling influences trafficking, T-cell receptor expression, and T-cell pathogenesis, in the NOD model of type 1 diabetes." *Immunology* **152**(2): 243-254.

van der Maaten, L. a. H., G. (2008). "Visualizing Data using t-SNE." *Journal of Machine Learning Research* **9**: 2579-2605.

van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." *J Leukoc Biol* **67**(1): 2-17.

van Roon, J. A., M. C. Verweij, M. W. Wijk, K. M. Jacobs, J. W. Bijlsma and F. P. Lafeber (2005). "Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages." *Arthritis Rheum* **52**(6): 1700-1710.

Varo, N., D. Vicent, P. Libby, R. Nuzzo, A. L. Calle-Pascual, M. R. Bernal, A. Fernandez-Cruz, A. Veves, P. Jarolim, J. J. Varo, A. Goldfine, E. Horton and U. Schonbeck (2003). "Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones." *Circulation* **107**(21): 2664-2669.

Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." *Science* **273**(5271): 104-106.

Waid, D. M., R. J. Wagner, A. Putnam, G. M. Vaitaitis, N. D. Pennock, D. C. Calverley, P. Gottlieb and D. H. Wagner, Jr. (2007). "A unique T cell subset described as CD4loCD40+ T cells (TCD40) in human type 1 diabetes." *Clin Immunol* **124**(2): 138-148.

Wang, X. S., P. F. Wen, M. Zhang, L. F. Hu, J. Ni, L. J. Qiu, Y. Liang, W. Zhao, Q. Huang, S. S. Tao, W. D. Xu, C. C. Feng, H. Cen, R. X. Leng, H. F. Pan and D. Q. Ye (2014). "Interleukin-7 receptor single nucleotide polymorphism rs6897932 (C/T) and the susceptibility to systemic lupus erythematosus." *Inflammation* **37**(2): 615-620.

Warshauer, J. T., J. A. Bluestone and M. S. Anderson (2020). "New Frontiers in the Treatment of Type 1 Diabetes." *Cell Metab* **31**(1): 46-61.

Wen, L., R. E. Ley, P. Y. Volchkov, P. B. Stranges, L. Avanesyan, A. C. Stonebraker, C. Hu, F. S. Wong, G. L. Szot, J. A. Bluestone, J. I. Gordon and A. V. Chervonsky (2008). "Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes." *Nature* **455**(7216): 1109-1113.

Willcox, A., S. J. Richardson, A. J. Bone, A. K. Foulis and N. G. Morgan (2009). "Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes." *Clin Exp Immunol* **155**(2): 173-181.

Wong, K. L., J. J. Tai, W. C. Wong, H. Han, X. Sem, W. H. Yeap, P. Kourilsky and S. C. Wong (2011). "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets." *Blood* **118**(5): e16-31.

Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch and J. C. Mathison (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." *Science* **249**(4975): 1431-1433.

Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R. R. Marell, D. Fliser and G. H. Heine (2011). "SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset." *Blood* **118**(12): e50-61.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn and M. B. Lutz (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." *Blood* **116**(16): e74-80.

5 DANKSAGUNG

Zum Ende dieser Arbeit möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Marc Jacobsen bedanken, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Unsere gemeinsamen Überlegungen am Whiteboard sowie die konstruktiven Diskussionen haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und werden mir genau wie seine Begeisterung für Wissenschaft und Forschung immer in guter Erinnerung bleiben.

Ein riesiges Dankeschön gebührt auch meiner Betreuerin PD Dr. Julia Seyfarth, die mir bei unzähligen Fragen stets zur Seite stand und immer ein offenes Ohr hatte. Ohne ihre klugen Ratschläge und ihren unermüdlichen Einsatz würde diese Arbeit in dieser Form sicherlich nicht existieren. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht vorstellen und wünschen können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Ko-Autoren, die mit ihrer hervorragenden Arbeit zur Veröffentlichung des Papers beigetragen und somit diese Arbeit ermöglicht haben.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Jacobsen bedanken, die meine Zeit im Labor zu einer sehr lehrreichen, aber auch sehr kurzweiligen und schönen Zeit gemacht haben. Hierbei sind zu nennen Anna, Sarah, Miguel, Ernest, Jean, Max, Norman, Fine und Bastian.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Rita und meiner Schwester Clara, und all meinen Freunden, die mich immer bedingungslos unterstützen und auch nach langen Labortagen oder Rückschlägen immer die richtigen Worte gefunden haben.

Meinem Vater Bernward danke ich dafür, dass er immer für mich da war und mir bis heute ein großes Vorbild ist. Ich denke jeden Tag an dich.