Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor der Klinik: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Charakterisierung der Regulation der Interleukin-7-Rezeptor-alpha-Kette auf humanen Monozyten in vitro

Dissertation

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

vorgelegt von Bastian Laurens Benner
2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Jacobsen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Für meine Familie.

In Dankbarkeit für ihren Rückhalt, ihren Glauben an mich und ihre Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Harelimana J, Ahor H, Benner B, Hellmuth S, Adankwah E, Minadzi D, Aniagyei W, Lamptey M, Yeboah A, Arthur J, Abass M, Debrah L, Owusu D, Mayatepek E, Seyfarth J, Phillips R, Jacobsen M, (2022), Cytokine-induced transient monocyte IL-7Ra expression and the serum milieu in tuberculosis. *European Journal of Immunology* (Volume 52) 958-969

Bei der erneuten Prüfung der Originaldaten im Zuge der Erstellung dieser Dissertationsschrift wurde ein Fehler in der publizierten Datenauswertung festgestellt. Die hier dargestellten Ergebnisse beruhen auf den Originaldaten; eine Korrektur der betroffenen Abbildung wird beim Journal eingereicht.

Zusammenfassung

Interleukin-7 (IL-7) ist ein Zytokin mit wichtigen Aufgaben im Bereich der Reifung, Differenzierung und des Überlebens von Leukozyten. Die zentrale Bedeutung von IL-7 wurde bisher vor allem für Lymphozyten detailliert untersucht. Über die letzten Jahre hinweg zeigte sich jedoch zunehmend, dass IL-7 und der Interleukin-7-Rezeptor (IL-7R) auch in der Homöostase von Monozyten und Makrophagen wichtige Rollen einnehmen. Im Gegensatz zu T-Zellen exprimieren Monozyten den IL-7R grundsätzlich in einem sehr geringen Ausmaß, können jedoch nach Aktivierung mit einer verstärkten Expression des IL-7R reagieren. In dieser Arbeit sollte die Regulation des IL-7R auf humanen Monozyten charakterisiert und die Expression des Rezeptors in Abhängigkeit von IL-7 sowie von inflammatorischen Stimuli beschrieben werden.

Zur Durchführung wurden Vollblutspenden von gesunden Probanden entnommen, Monozyten isoliert und in Reinkultur inkubiert. Verschiedene Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS), mykobakterielle Zellwandbestandteile (CW) sowie der Wachstumsfaktor GM-CSF wurden zur Aktivierung der Monozyten verwendet. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression des IL-7R zu unterschiedlichen Zeitpunkten über eine Gesamtdauer von 40 Stunden untersucht.

Die primären Fragestellungen beschäftigten sich mit der IL-7R-Expression nach Aktivierung über den Zeitverlauf. Außerdem wurde die Abhängigkeit der IL-7R-Expression von der kontinuierlichen Anwesenheit eines aktivierenden Stimulus untersucht sowie ob die Regulation der IL-7R-Expression auf Monozyten reversibel ist. Schließlich sollte der direkte Einfluss von IL-7 auf die Verfügbarkeit des eigenen Rezeptors charakterisiert werden.

In den Ergebnissen zeigte sich, dass die IL-7R-Expression auf aktivierten Monozyten einer komplexen Regulation unterliegt. Nach Stimulation kam es zur Zunahme der oberflächlichen Expression des IL-7R. Eine Entfernung des Stimulus führte zu einer Reduktion der IL-7R-Expression. Eine erneute Stimulation mit identischen Bedingungen zeigte, dass Monozyten nach einer vorübergehenden Reduktion zu einer Reexpression des IL-7R in der Lage sind. Die Inkubation mit IL-7 führte zu einer Runterregulation der Oberflächenexpression.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Änderungen der IL-7/IL-7R-Achse in Monozyten komplex sind und mehreren Einflussfaktoren unterliegen. Zukünftige Versuche könnten an diese Ergebnisse anknüpfen, indem intrazelluläre Mechanismen nach Aktivierung des IL-7R näher charakterisiert werden.

Abstract

Interleukin-7 (IL-7) is a cytokine with crucial impact on maturation, differentiation and survival of leukocytes. So far, the significance of IL-7 has been investigated primarily on lymphocytes. However, recent studies have shown that IL-7 and the interleukin-7 receptor (IL-7R) also have essential functions in homeostasis of monocytes and macrophages. In contrast to T cells, monocytes usually show very low levels of IL-7R expression. After activation, however, they can exhibit IL-7R expression. The main objective of this study was to characterize the regulation of IL-7R on human monocytes and to describe the receptor expression in response to inflammatory stimuli and IL-7.

For this study, samples of whole blood from healthy donors were obtained and monocytes were isolated and subsequently incubated. Exposure to different stimuli, including lipopolysaccharide (LPS), mycobacterial cell wall components (CW), and growth factor GM-CSF was used for activation of monocytes. IL-7R expression was analyzed by flow cytometry at different time points over a conclusive incubation period of 40 hours.

The central issues focused on transient changes of IL-7R expression following monocyte activation. Additionally, the dependency of IL-7R expression on the continuous presence of an activating stimulus was investigated and whether its regulation is reversible. Finally, the direct effect of IL-7 on the availability of its own receptor was characterized.

The results demonstrated that IL-7R expression on activated monocytes is subject to complex regulatory mechanisms. Following stimulation, surface expression of IL-7R increased. Removal of the stimulus resulted in a reduction of IL-7R expression. Upon re-stimulation under identical conditions, monocytes were capable of re-expressing IL-7R after this transient downregulation. Incubation with IL-7 led to a decrease in surface expression and showed evidence of a negative feedback mechanism.

Overall, these findings indicate that alterations of the IL-7/IL-7R axis in monocytes are multifactorial. Future studies could build on these results by investigating intracellular mechanisms following IL-7R activation, including analyses of transcriptional and post-translational processes.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
CD	*Cluster of differentiation*
CW	Mykobakterielle Zellwandbestandteile *(cell wall)*
DAMP	*Damage-associated molecular patterns*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FBS	*Fetal bovine serum*
FoP	*Frequency of positives*
FSC-A	*Forward scatter-area*
FSC-H	*Forward scatter-height*
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomavirus
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-7	Interleukin-7
IL-7R	Interleukin-7-Rezeptor
IL-7Rα	Interleukin-7-Rezeptor-alpha-Kette
IL2RG	Genort für die Interleukin-2-Rezeptor-gamma-Kette
IL7RA	Genort für die Interleukin-7-Rezeptor-alpha-Kette
JAK-1	Janus-Kinase-1
JAK-3	Janus-Kinase-3
LPS	Lipopolysaccharid
MDM	*Monocyte-derived macrophages*
MFI	*Mean fluorescence intensity*
MHC	*Major histocompatibility complex*
mRNA	*Messenger ribonucleic acid*
NF-κB	*Nuclear factor kappa B*
NK	*Natural killer*
NSCLC	*Non-small cell lung cancer*
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells*
PBS	*Phosphate buffered saline*
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
SCID	*Severe combined immunodeficiency*
sIL-7Rα	Lösliche Interleukin-7-Rezeptor alpha Kette
SNP	*Single nucleotide polymorphism*
SSC-A	*Side scatter-area*
STAT	*Signal transducers and activators of transcription*
TGF-β	*Transforming growth factor beta*
TH	T-Helfer-Zelle
TLR	*Toll-like receptor*
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
V(D)J	*Variable; Diversity; Joining*
Via	Viabilitätsfarbstoff

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Die Biologie der IL-7/IL-7R-Achse 1

1.2 Monozyten und Makrophagen als Zielzellen der IL-7/IL-7Rα-Achse 3

1.2.1 *Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen als Zellen der angeborenen Immunantwort 3*

1.2.2 *Vermittelte Signale der IL-7-/IL-7R-Achse in Monozyten und Makrophagen und regulatorische Effekte 4*

1.3 IL-7 und der IL-7R im pathophysiologischen Kontext 6

1.3.1 *Infektionserkrankungen (Tuberkulose) 6*

1.3.2 *Autoimmun- und Tumorerkrankungen 7*

1.4 Ziele der Arbeit 8

2. Material und Methoden 9

2.1 Material 9

2.1.1 *Antikörper 9*

2.1.2 *Chemikalien 9*

2.1.3 *Computerbasierte Anwendungsprogramme 9*

2.1.4 *Laborverbrauchsmaterial 10*

2.1.5 *Stimulanzien 11*

2.1.6 *Weitere Labormaterialien und Geräte 11*

2.1.7 *Verwendete Zellkulturmedien und Puffer 12*

2.2 Methoden 13

2.2.1 *Übersicht 13*

2.2.2 *Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials 15*

2.2.3 *Verarbeitung des biologischen Untersuchungsmaterials und experimentelle Durchführung 16*

2.2.4 *Verwendung des Durchflusszytometers LSR Fortessa 21*

2.2.5 *Auswertung 22*

2.2.6 *Ethikantrag 25*

3. Ergebnisse 26

3.1 Vergleich unterschiedlicher Stimuli zur Induktion der IL-7R-Expression im Zeitverlauf 26

3.2 Expression des IL-7Rα nach Entfernung des Stimulus sowie nach Restimulation 29

3.3 Einfluss von IL-7 auf den Expressionsverlauf 35

3.4 Hinweis zu Vorveröffentlichungen 38

4. Diskussion 39

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 39

4.2 Stimulusabhängige Hochregulation der IL-7R-Expression 40

4.3 IL-7Rα-Expression nach Stimulusentzug und Restimulation 41

4.4 Einfluss von IL-7 42

4.5 Limitationen 44

4.6 Fazit 45

5. Literaturverzeichnis 46

6. Anhang 52

1. Einleitung

1.1 Die Biologie der IL-7/IL-7R-Achse

Ziel dieser Arbeit ist es, den bislang noch wenig erforschten Einfluss von Interleukin-7 (IL-7) und des Interleukin-7-Rezeptors (IL-7R) auf die Regulation von Monozyten und Makrophagen zu charakterisieren. IL-7 ist ein Zytokin, welches für verschiedene Immunzellarten vitale Funktionen in Bezug auf Homöostase, Wachstum und Überleben ausübt.

Der genetisch für IL-7 codierende Bereich befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 8q12-13 (Sutherland, Baker et al. 1989). Das Gesamtprotein umfasst 177 Aminosäuren. Nach Abspaltung eines Signalpeptids mit einer Größe von 25 Aminosäuren besteht die biologisch aktive Form von IL-7 aus 152 Aminosäuren (Namen, Lupton et al. 1988). Als essenzielles und lymphoproliferatives Zytokin wurde IL-7 früh in seiner Rolle als Wachstumsfaktor für prä-B-Zellen in Knochenmarkskulturen beschrieben (Costello, Imbert et al. 1993). Die physiologische Synthese von IL-7 findet insbesondere in den Stromazellen von Knochenmark und Thymus, Epithelzellen und Leberzellen statt (Chen, Tang et al. 2021).

Immunologisch hat IL-7 vielfältige bedeutende Funktionen. Unter anderem wird die Reifung, die Proliferation, aber auch das Überleben unterschiedlicher Lymphozyten, darunter vor allem T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen maßgeblich beeinflusst (Chen, Tang et al. 2021). Im Rahmen der T-Zell-Entwicklung im Thymus (Thymopoese) ist der Wechsel von doppelt negativen Thymozyten ($CD4^-$ und $CD8^-$; *cluster of differentiation*) in doppelt positive T-Zell-Vorläufer ($CD4^+$ und $CD8^+$) von IL-7 vermittelten Signalen abhängig (ElKassar and Gress 2010). Angeborene Erkrankungen, die das IL-7-System betreffen, führen zu schweren Pathologien und unterstreichen die Relevanz dieses Zytokins (Chen, Tang et al. 2021). So können Störungen der IL-7R-Expression zur Entwicklung des Schweren kombinierten Immundefektes (SCID) führen (Puel, Ziegler et al. 1998). Eine Mutation, die zu einem IL-7-Mangel führt, wurde mit einer Prädisposition zur Entwicklung von HPV-3-positiven Hautläsionen und Plattenepithelkarzinomen assoziiert (Horev, Unger et al. 2015). Die *V(D)J*-Rekombination ist ein weiterer wichtiger, von IL-7 abhängiger biologischer Prozess (Candéias, Muegge et al. 1997). Für das Überleben von T-Zellen, die nicht unter der dauerhaften Stimulation von Antigeneinflüssen stehen, ist IL-7 unerlässlich (Mackall, Fry et al. 2011). Auch in der Reifung von frühen B-Zellen spielt IL-7 eine wichtige Rolle. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass IL-7 essenziell für die Differenzierung von Pro-B- zu Prä-B-Zellen ist (Wei, Zeff et al. 2000).

Der IL-7-Rezeptor (IL-7R) ist ein transmembranöses und heterodimeres Protein, welches aus einer γ-Kette (CD132, IL-2RG) und einer α-Kette (CD127, IL-7Rα) besteht. Die γ-Kette findet sich als Bestandteil der Rezeptoren weiterer Zytokine (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 und IL-21) (Barata, Durum et al. 2019, Barros, Berthoud et al. 2021). Der IL-7Rα wird durch das Gen IL7RA codiert, welches sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5p befindet (Teutsch, Booth et al. 2003). Der Genort für die γ-Kette ist als IL2RG bekannt und befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq13.1) (Lin and Leonard 2018).

Die Bindung von IL-7 an den IL-7R führt zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der im Zytosol vorliegenden Janus-Kinase-1 (JAK1), welche mit dem IL-7Rα assoziiert ist. Die Janus-Kinase-3 (JAK3), die ebenfalls im Zytosol zu finden ist, ist mit der γ-Kette des IL-7R gekoppelt (Ward 2026). Beide Enzyme entstammen der Familie der Tyrosinkinasen und aktivieren sich gegenseitig durch Phosphorylierung (Ghoreschi, Laurence et al. 2009). Durch die aktivierten Tyrosinkinasen kommt es anschließend zur Aktivierung von Proteinen aus der Gruppe der *STAT*-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*). Dazu zählen *STAT-3* und *STAT-5*, die als Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Hofmeister, Khaled et al. 1999, Chen, Tang et al. 2021). Der beschriebene JAK/*STAT*-Signalweg führt zu einer verminderten Transkription des IL7RA-Gens und darüber zu einer verminderten Synthese von IL-7Rα; die IL-7/IL-7Rα-Achse unterliegt also einem negativen Feedbackmechanismus (Ghazawi, Faller et al. 2013).

Zusätzlich zu der beschriebenen Regulation auf Ebene der Proteinbiosynthese gibt es noch weitere Mechanismen, die die Expression von IL-7Rα an der Zelloberfläche beeinflussen. Auf T-Zellen führt die Bindung von IL-7 an den IL-7R zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose des IL-7R. In Ruhebedingungen wird die IL-7R-Expression durch ein Gleichgewicht aus Clathrin-vermittelter-Endozytose und Reexpression im Sinne eines Recyclings charakterisiert. Nach der Bindung von IL-7 an seinen Rezeptor verschiebt sich dieses Gleichgewicht hin zu einer vermehrten Internalisierung des IL-7R. Konsekutiv erfolgt auch ein vermehrter Abbau des Rezeptors in Lysosomen und Proteasomen (Henriques, Rino et al. 2010).

Zu den durch IL-7R-Aktivierung vermittelten Funktionen gehört die Hemmung der Apoptose in bestimmten Zelltypen, darunter B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen. Eine Aktivierung der Src-Kinase aus der Familie der Tyrosinkinasen in der IL-7/IL-7Rα-Achse kann eine Verstärkung der *STAT*-Aktivierung verursachen. Darüber hinaus wird nach Aktivierung der IL-7/IL-7Rα-Achse verstärkt der Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg (PI3K) aktiviert, was zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB, Protoonkogen) führt. Die

PKB reguliert das Überleben der Zelle durch Kontrolle von Apoptoseprogrammen, unter anderem durch Phosphorylierung und Inhibition von proapoptotischen Proteinen (Jones, Parsons et al. 2000, Chen, Tang et al. 2021).

Der IL-7Rα ist konstitutiv auf naiven T-Zellen exprimiert. Für naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ist diese hohe Expression für Überleben und Homöostase bedeutsam. Im Anschluss an die mittels Antigen-Kontakt vermittelte T-Zell-Rezeptor-Aktivierung kommt es zu einer zügigen Abnahme der IL-7Rα-Expression auf T-Zellen mit anschließender verminderter Sensibilität der aktivierten T-Zellen gegenüber IL-7 (Alves, van Leeuwen et al. 2008). Bei diesem Prozess spielen unterschiedliche Zytokine, wie unter anderem Interleukin-2 (IL-2) eine wesentliche Rolle (Barata, Durum et al. 2019). Ein weiterer, zentraler Regulator in diesem Kontext und auf Ebene der zellulären Transkription der IL7RA-Genregion ist der Transkriptionsfaktor FoxO1. PI3K-vermittelte Phosphorylierung bewirkt eine verminderte Aktivität von FoxO1 und dadurch eine Erniedrigung der IL-7Rα-Expression (Chen, Tang et al. 2021). Die Exposition von naiven T-Zellen gegenüber IL-7 bewirkt eine deutliche Reduktion der oberflächlichen IL-7Rα-Expression. Die Beendigung der IL-7-Exposition führt jedoch zu einer Reexprimierung von IL-7Rα und damit wiederum zu einem CD127-positiven Phänotyp (Alves, van Leeuwen et al. 2008). Innerhalb unterschiedlicher Subpopulationen von T-Zellen gibt es grundsätzlich verschiedene basale Expressionslevel des IL-7Rα. Auf regulatorischen T-Zellen mit einer initial geringen Expression von IL-7Rα konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Art der Aktivierung vorübergehende Veränderungen in der IL-7Rα-Expression stattfinden (Simonetta, Chiali et al. 2010, Tabares, Berr et al. 2018). Auf Gedächtnis-T-Zellen hingegen wurde wiederum eine erhöhte Expression von IL-7Rα festgestellt (Barata, Durum et al. 2019).

1.2 Monozyten und Makrophagen als Zielzellen der IL-7/IL-7Rα-Achse

1.2.1 Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen als Zellen der angeborenen Immunantwort

Monozyten sind heterogene Vorläuferzellen des Blutes, die in klassische ($CD14^+$, $CD16^-$), intermediäre ($CD14^+$, $CD16^+$) und alternative/nicht-klassische ($CD14^-$, $CD16^+$) Gruppen unterteilt werden können und immunologisch unterschiedliche Funktionen ausüben (Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al. 2010). Zu ihren primären Funktionen gehören unter anderem die Phagozytose von Erregern und die Produktion von unterschiedlichen Zytokinen (Lara, Akula et al. 2022). Im inflammatorischen Milieu werden Chemokine freigesetzt, die einen chemischen Gradienten (chemotaktischer Gradient) aufbauen, wodurch Monozyten zum Ort der Entzündung migrieren können (Martinet, Martinet et al.

1994). Ihrerseits wiederum sind Monozyten in der Lage, den chemotaktischen Gradienten durch Sekretion von Chemokinen gezielt zu modulieren und so weiteren Immunzellen Signale zur Invasion in entzündetes Gewebe zu geben (Dash, Gupta et al. 2024). Nach Aktivierung differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen, welche im Zielgewebe spezifische Funktionen übernehmen, darunter die Phagozytose von Pathogenen, abgestorbenem Zellmaterial und die Modulation der Entzündungsreaktion (Aderem and Underhill 1999, Muntjewerff, Meesters et al. 2020). Eine weitere zentrale Aufgabe ist die Präsentation von Antigenen gegenüber Lymphozyten und die Aktivierung dieser (Muntjewerff, Meesters et al. 2020). Monozyten und Makrophagen reagieren dynamisch auf inflammatorische Reize und passen sowohl ihren Phänotyp als auch ihr Zytokinprofil rasch an das lokale Milieu und die lokalen Anforderungen an (Lara, Akula et al. 2022).

Die Aktivierung von Monozyten ist entscheidend für die Ausübung ihrer Effektorfunktionen und kann durch unterschiedliche Stimuli induziert werden. Beispielsweise führt die Bindung sogenannter *Pathogen-associated molecular patterns* (*PAMPs*), wie dem bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS) und *Damage-associated molecular patterns* (*DAMPs*) an *Toll-like receptors* (TLRs) zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Yamamoto and Takeda 2010, Jentho and Weis 2021). Nach der Aktivierung wird die Regulation von kostimulatorischen und antigenpräsentierenden Molekülen verändert. Dadurch kann die Interaktion mit Zellen des adaptiven Immunsystems gesteuert werden. Dabei nimmt das Oberflächenprotein CD40 eine zentrale Rolle ein. Durch Bindung des Liganden CD40L wird die Aktivierung von Monozyten verstärkt und die Zytokinantwort konsekutiv mitbeeinflusst (Sinistro, Almerighi et al. 2008, Lee, Tam et al. 2017). Eine Stimulation mit Substanzen, wie dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) oder bestimmten Zytokinen führt zu einer vermehrten Expression von CD40 auf der Zelloberfläche von Monozyten (Alderson, Armitage et al. 1993). Veränderungen der CD40-Expression können als Marker für den Aktivierungszustand von Monozyten angesehen werden (Alderson, Armitage et al. 1993, Mach, Schönbeck et al. 1997, Vuong, Stein-Merlob et al. 2022).

1.2.2 Vermittelte Signale der IL-7-/IL-7R-Achse in Monozyten und Makrophagen und regulatorische Effekte

Die zentrale Rolle von IL-7 in der Biologie von Lymphozyten wurde bereits früh durch *Knockout*-Modelle der IL-7/IL-7R-Achse beschrieben. Das Fehlen von IL-7 führt in Mäusen zu niedrigen B- und T-Zellzahlen (von Freeden-Jeffry, Vieira et al. 1995). Der *Knockout* des IL-7R beeinträchtigt die lymphozytäre Reifung und führt ebenfalls zu einer

verminderten Anzahl an Lymphozyten (Peschon, Morrissey et al. 1994). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass auch Monozyten und Makrophagen den IL-7R exprimieren können (Chen, Kim et al. 2013, Al-Mossawi, Yager et al. 2019). Monozyten, die IL-7Rα auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeigen in Autoimmunerkrankungen charakteristische Transkriptionsprofile und reagieren auf IL-7 mit einer veränderten Genexpression (Al-Mossawi, Yager et al. 2019). Klinisch konnten sowohl in Patienten mit akuter Spondyloarthritis als auch in Patienten mit Rheumatoider Arthritis Subpopulationen von Monozyten identifiziert werden, die den IL-7Rα exprimieren und dadurch eine höhere Empfindlichkeit für IL-7-Signale aufwiesen (Al-Mossawi, Yager et al. 2019).

Beschriebene Effekte von IL-7 auf Monozyten umfassen proinflammatorische Mechanismen, wie die Ausschüttung von Zytokinen oder die Aktivierung weiterer Immunzellen sowie chemotaktische Effekte (Chen, Kim et al. 2013). Bezüglich der Signaltransduktion von IL-7 in Monozyten existieren Hinweise darauf, dass diese ähnlich wie in T-Zellen durch Aktivierung des JAK/*STAT*5-Signalweges vermittelt ist (Li, Wang et al. 2019). Nach Aktivierung des IL-7R kommt es mittels PI3K-abhängiger zellulärer Signalwege über die Aktivierung von NF- κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) zur Transkription von proinflammatorischen Genen (Li, Paul et al. 2012, Wang, Kong et al. 2022). Weiterhin führt die Exposition von PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) und Monozyten gegenüber IL-7 zu einer erhöhten Zytokinproduktion, unter anderem des proinflammatorischen IL-6 (Alderson, Tough et al. 1991). In Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurde IL-7 zudem als Substanz beschrieben, die chemotaktische Eigenschaften ausüben kann und die Migration von IL-7R-positiven Monozyten beeinflusst (Chen, Kim et al. 2013).

Genetische Varianten des IL7RA-Gens können die IL-7-Signalübertragung in Monozyten beeinflussen und wurden mit veränderten inflammatorischen Transkriptionsprofilen assoziiert (Rane, Rahman et al. 2017, Al-Mossawi, Yager et al. 2019).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Oberflächenexpression von IL-7Rα auf Monozyten in der Regel niedrig, was die Untersuchung von IL-7-vermittelten Effekten erschwert. Durch unterschiedliche inflammatorische Stimuli ist eine deutliche Hochregulation von IL-7Rα induzierbar. Beschrieben sind diese Effekte unter anderem für verschiedene Zytokine, darunter TNF-α und LPS (Al-Mossawi, Yager et al. 2019). Störungen dieser Effekte finden sich insbesondere im Kontext chronisch-entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen, aber auch bei Infektionskrankheiten. Im Vergleich zu zirkulierenden Monozyten liegen zu IL-7-vermittelten Effekten auf differenzierte Makrophagen bislang nur wenige experimentelle Daten vor. Damit besteht weiterhin eine relevante Forschungslücke hinsichtlich der IL-7-vermittelten Regulation differenzierter

myeloischer Zellen. Zur genaueren Charakterisierung der IL-7/IL-7Rα-Achse in Monozyten könnte daher die Analyse von aktivierten Monozyten mit einem CD127-positiven Phänotyp sinnvoll sein.

1.3 IL-7 und der IL-7R im pathophysiologischen Kontext

1.3.1 Infektionserkrankungen (Tuberkulose)

Tuberkulose ist eine Infektionserkrankung, die durch den Erreger Mykobakterium tuberculosis ausgelöst wird. Tuberkulose kann eine Vielzahl an Organsystemen betreffen, vor allem stehen jedoch pulmonale Manifestationen im Vordergrund. Nach Erstkontakt mit dem Erreger kommt es zunächst zu einer Primärinfektion mit meist unspezifischen Symptomen (Bloom, Atun et al. 2017). Häufig geht die Erkrankung in der Folge in ein latentes Stadium über. Die Erreger entziehen sich dabei der Immunabwehr und überleben intrazellulär unter anderem in Makrophagen (Stutz, Clark et al. 2018). Diese infizierten Zellen können durch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen eliminiert werden.

Eine Immunsuppression jeglicher Form kann zu einer erneuten Aktivierung von Mykobakterium tuberculosis und dadurch klinisch zum akuten Krankheitsausbruch führen. Eine akute Tuberkulose präsentiert sich oft mit eher unspezifischen Symptomen, z.B. Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust (als B-Symptomatik bezeichnet). Liegt eine Lungentuberkulose vor, entwickeln sich zusätzliche pulmonale Symptome, wie Dyspnoe oder Husten mit Sputumproduktion (Lyon and Rossman 2017). Auch weitere Organsysteme wie lymphatische Organe, Nieren und ableitende Harnwege sowie Knochen oder Gelenke können befallen sein.

In *ex-vivo* Experimenten konnte beobachtet werden, dass IL-7 die antibakterielle Aktivität von mit Mykobakterium avium infizierten Makrophagen gesunder Probanden erhöhen konnte (Tantawichien, Young et al. 1996). In vitro steigert IL-7 die durch *MDMs* (*monocyte derived macrophages*) vermittelte Kapazität zur Elimination von Mykobakterien (Adankwah, Harelimana et al. 2021). In Monozyten von Patienten mit Tuberkulose wurde experimentell eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber IL-7 gezeigt. Die herabgesetzte IL-7-Sensitivität ging mit einer reduzierten STAT5-Phosphorylierung einher und könnte mit einer beeinträchtigten antimykobakteriellen Immunantwort assoziiert sein (Adankwah, Harelimana et al. 2021).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-7 eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der Infektion mit Mykobakterien spielt und Effekte vermittelt, die zu einer erhöhten Elimination von Mykobakterien führen. Immunzellen reagieren auf Kontakt zu mykobakteriellen Bestandteilen mit einer Hochregulation der IL-7R-Expression. In

Patienten mit Tuberkulose jedoch liegt eine reduzierte Expression des IL-7R auf Monozyten und eine verminderte Sensitivität gegenüber IL-7 vor.

1.3.2 Autoimmun- und Tumorerkrankungen

In mehreren Autoimmunerkrankungen, unter anderem in Rheumatoider Arthritis, bei Typ-1-Diabetes und bei der Multiplen Sklerose, wurden genetische Varianten des IL-7R sowie Veränderungen der Aktivität der IL-7/IL-7R-Achse beschrieben, die mit der Entstehung und Pathophysiologie dieser Erkrankungen assoziiert sind (Mackall, Fry et al. 2011, Al-Mossawi, Yager et al. 2019). So fördert IL-7 das Überleben autoreaktiver T-Zell-Subtypen, die eine Rolle in der Ausbildung von Autoimmunität spielen. Die Aktivierung von TH1-Zellen (T-Helfer-Zellen) kann beispielsweise über eine Sekretion von IFN-γ (Interferon-γ) in die Exprimierung von IL-7Rα auf myeloischen Zellen eingreifen und dadurch die IL-7-vermittelten Gelenkentzündungen in Rheumatoider Arthritis verstärken (Meyer, Parmar et al. 2022). Neben diesen hauptsächlich über T-Zellen vermittelten Effekten wurden auch direkte Einflüsse von IL-7 auf Monozyten und andere mononukleäre Zellen des angeborenen Immunsystems in Autoimmunerkrankungen beschrieben. Lokale IL-7-Freisetzung fördert die Migration von M1-Makrophagen (proinflammatorische Makrophagen) ins Gelenk, die durch verstärkte Osteoklastogenese zur Knochenerosion und zur Verstärkung arthritischer Prozesse beitragen können (Kim, Chang et al. 2020). Bei Patienten mit Spondyloarthritis konnte bei Monozyten in der Synovialflüssigkeit ein Subtyp mit erhöhter IL-7R-Expression nachgewiesen werden (Al-Mossawi, Yager et al. 2019). Auch bei Typ-1-Diabetes kommt es zu einer Veränderung der IL-7/IL-7R-Achse. So konnte eine reduzierte IL-7R-Expression auf bestimmten Monozyten-Subgruppen in Patienten mit Typ-1-Diabetes beobachtet werden (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021). Diese Erkenntnisse legen eine komplexere Rolle von IL-7 in Autoimmunerkrankungen dar, die über die klassischen T-Zell-vermittelten Effekte hinausgeht und auch Zellen des angeborenen Immunsystems betrifft.

Mutationen von IL7RA, IL2RG sowie von JAK3 können im Menschen zu Formen des Schweren Kombinierten Immundefektes (*SCID*) führen, bei denen bestimmte lymphatische Zelllinien nicht ausgebildet werden (Puel and Leonard 2000). Auch im Mausmodell führt die Deletion von IL-7 zu einer ausgeprägten Lymphopenie und schweren Störungen der B- und T-Zellentwicklung (von Freeden-Jeffry, Vieira et al. 1995).

Nicht nur für die Entwicklung und Proliferation von Leukozyten scheint IL-7 relevant zu sein (Bednarz-Misa, Bromke et al. 2021), sondern auch in malignen Erkrankungen konnten IL-7-vermittelte Effekte festgestellt werden. In soliden Tumoren, wie

beispielsweise dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) wurden IL-7-abhängige Mechanismen sowohl zur Verhinderung der Apoptose (Liu, Wang et al. 2014) als auch zur Proliferation von Tumorzellen gezeigt (Ming, Jiang et al. 2012). Die Effekte von IL-7 auf chronische und akute Leukämien sind Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten und wurden für mehrere hämatologische Malignome beschrieben (Bednarz-Misa, Bromke et al. 2021). Auch in diesen Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass IL-7 die Proliferation neoplastischer Zellen fördert (Digel, Schmid et al. 1991).

1.4 Ziele der Arbeit

Bisher konnten zahlreiche Studien die Relevanz der IL-7/IL-7Rα-Achse für die Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen und Malignomen zeigen. Trotz dieser klinischen Relevanz ist die physiologische Funktion von IL-7 auf Monozyten bislang nur unzureichend verstanden. Beobachtungen beispielsweise aus Tuberkulose oder Typ-1-Diabetes zeigen zwar eine veränderte Regulation der IL-7/IL-7Rα-Achse, lassen jedoch nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die physiologische IL-7-Sensitivität und die grundlegende Funktion von IL-7 auf Monozyten zu. Um diese Veränderungen valide einordnen zu können, müssen die Mechanismen der IL-7/IL-7Rα-Achse zunächst unter definierten Bedingungen in aktivierten Monozyten gesunder Spender untersucht werden. Dieser Ansatz ermöglicht die Untersuchung von Veränderungen der IL-7Rα-Expression sowie direkter IL-7-vermittelter Effekte auf Monozyten unter kontrollierten Bedingungen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die nähere Charakterisierung der Regulation und funktionellen Bedeutung der IL-7/IL-7Rα-Achse auf humanen Monozyten. Im Mittelpunkt stehen dabei drei zentrale Zielsetzungen: Die Analyse der stimulusabhängigen Hochregulation des IL-7Rα, die Untersuchung des Einflusses einer kontinuierlichen beziehungsweise entzogenen Stimulation auf die IL-7Rα-Expression und die Charakterisierung des Einflusses von IL-7 auf die Expression des IL-7Rα. Mit der Untersuchung dieser Themen sollen neue Einblicke in die Regulation der IL-7/IL-7Rα-Achse auf Monozyten gewonnen werden. Hieraus resultierende Ergebnisse sollen zum tieferen Verständnis der physiologischen Rolle der IL-7-Achse in Zellen der myeloiden Linie beitragen und den Weg für weitergehende Untersuchungen der Pathophysiologie von Krankheitsbildern wie Tuberkulose und Autoimmunerkrankungen ebnen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Viability dye	-	E780	eBiosciences
CD14	M5E2	BV650	BD Biosciences
CD16	3G8	APC	BioLegend
CD40	5C3	AF488	BioLegend
CD127	A019D5	AF700	BioLegend
HLA-DR	L243	BV786	BioLegend

Tabelle 1: ***Verwendete Antikörper***

2.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Ampuwa (H2O steril)	Fresenius Kabi
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Thermo Fisher Scientific
Histopaque-1077 Hybri-Max (Ficoll)	Sigma-Aldrich
Humanes Interleukin-7	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Medium without Glutamin	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 2: ***Verwendete Chemikalien***

2.1.3 Computerbasierte Anwendungsprogramme

Programm	Hersteller
EndNote	Alfasoft GmbH
FACSDiva	BD Biosciences

FlowJo	Treestar
GraphPad Prism	GraphPad
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
SPSS	IBM

*Tabelle 3: **Verwendete Software***

2.1.4 Laborverbrauchsmaterial

Bezeichnung	**Hersteller**
Cell Culture Microplate 96 Well U-Bottom Plates, Polypropylene	Greiner Bio
Abdeckplatten, 9 mm	Greiner Bio
Falcon® 5 ml Round Bottom Polystyrene Test Tube, REF 352008	Falcon by Corning
Microdilution Tube 1,2 ml	StarLab
Graduated Filter tips (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	StarLab
Bevelled Tips refill (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	StarLab
BD Vacutainer Einmalhalter	BD Biosciences
BD Vacutainer Blood Collection Needle	BD Biosciences
BD Vacutainer Lithium-Heparin Blood Collection Tube, 6 ml	BD Biosciences
15 ml Falcon Tubes	Greiner Bio
50 ml Falcon Tubes	Greiner Bio
Corning Costar Stripette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Merck
Biosphere SafeSeal Tube 1,5 ml	Sarstedt
Safe-Lock microcentrifuge Tubes 0,5 ml	Eppendorf
Safe-Lock microcentrifuge Tubes 2,0 ml	Eppendorf

*Tabelle 4: **Verwendete Verbrauchsmaterialien***

2.1.5 Stimulanzien

Bezeichnung	Hersteller
Human Granulocyte macrophage colony-stimulating factor recombinant protein (GM-CSF)	Thermo Fisher Scientific
Lipopolysaccharid aus E. coli; O127:B8 (LPS)	Sigma-Aldrich
Mykobakterielle Zellwandbestandteile von M. tuberculosis (CW)	BEI-Resources

Tabelle 5: ***Verwendete Stimulanzien***

2.1.6 Weitere Labormaterialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
EasySep™ Magnet (Catalog #18000)	STEMCELL Technologies
EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion	STEMCELL Technologies
EasySep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail without CD16 Depletion, 1 ml (19359C.2)	STEMCELL Technologies
EasySep™ Magnetic Particles, 1 ml (19550)	STEMCELL Technologies
EasySep™ Magnet	STEMCELL Technologies
PIPETBOY 2	Integra
HERAsafe Abzug	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
HERAcell VIOS 160i Inkubator	Thermo Fisher Scientific
ROTINA 420R Zentrifuge	HettichLab
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Multiwell)	Eppendorf
LSR Fortessa	BD Biosciences
Kühlschrank 4 °C	Liebherr
Tiefkühler -20 °C	Liebherr
Flake Ice Maker SPR 80 W	NordCap
Mikroskop Olympus CD40-F200	Olympus
Neubauer Zählkammer	Marienfeld

Tabelle 6: ***Weitere verwendete Geräte***

2.1.7 Verwendete Zellkulturmedien und Puffer

Medium/Puffer	**Zusammensetzung**
Monozyten-Isolationsmedium	48,9 ml PBS, 1 ml FCS und 0,1 ml 0,5 molar EDTA
Makrophagen-Medium	44 ml RPMI 1640 Medium, 500 µl L-Glutamin, 500 µl HEPES, 5 ml FCS
MACS-Puffer	45 ml PBS, 5 ml 10xMACS

Tabelle 7: ***Verwendete Medien und Puffer***

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht

Zur Durchführung des Experimentes wurden Vollblutproben gesunder Probanden entnommen. Daraus wurden zunächst PBMCs isoliert und in einem weiteren Isolationsverfahren Monozyten gewonnen. Diese wurden stimuliert und anschließend inkubiert. Im zeitlichen Verlauf des Experimentes wurden an vier verschiedenen Zeitpunkten Messungen der oberflächlichen IL-7Rα-Expression durchgeführt:

1. unmittelbar nach der Probengewinnung (Start des Versuchs, bei 0 Stunden) zur Bestimmung der basalen Expression von CD127
2. Nach 16 Stunden
3. Nach 24 Stunden
4. Nach 40 Stunden.

In der finalisierten Version des Protokolls wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Dafür gab es fünf verschiedene Vollblutspender (n=5), die über die Studie aufgeklärt waren. Für jede einzelne Messung wurde mit technischen Duplikaten gearbeitet.

Nach der Isolation wurde die erste Messung mittels Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Monozyten und zur Erfassung der Expression von CD127 und CD40 sowie der Viabilität durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit GM-CSF, LPS oder CW in zwei unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert (siehe Tabelle 8).

Nach 16-stündiger Inkubationszeit wurden die Monozyten erneut mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Expression von CD127, CD40 und der Viabilität wurde auch an diesem, wie an allen folgenden Messzeitpunkten erhoben. Anschließend wurden die Zellen weiter inkubiert, beziehungsweise einer Intervention unterzogen. Danach lagen drei verschiedene Versuchsbedingungen vor:

1. Monozyten + Stimulus
2. Monozyten + Stimulus + IL-7
3. Monozyten + Puls

Der Puls bezeichnete die Entfernung des initialen Stimulus, sodass bei diesen Zellen nach 16-stündiger Stimulation die weitere Inkubation mit reinem Makrophagen-Medium, ohne Stimulus erfolgte. Nach insgesamt 24 Stunden folgte wiederum eine Messung per Durchflusszytometrie sowie eine erneute Inkubation. Für den weiteren Verlauf wurde eine zusätzliche Bedingung eingeführt: gepulste Proben, also Monozyten, denen der

initiale Stimulus entzogen wurde, wurden entweder mit dem identischen Stimulus in der gleichen Konzentration restimuliert oder ohne Intervention weiterhin inkubiert. In der letzten Inkubationsphase lagen damit vier verschiedene Bedingungen vor:

1. Monozyten + Stimulus
2. Monozyten + Stimulus + IL-7
3. Monozyten + Puls
4. Monozyten + Puls + Restimulation

Abbildung 1 dient zur Veranschaulichung des geschilderten experimentellen Ablaufs.

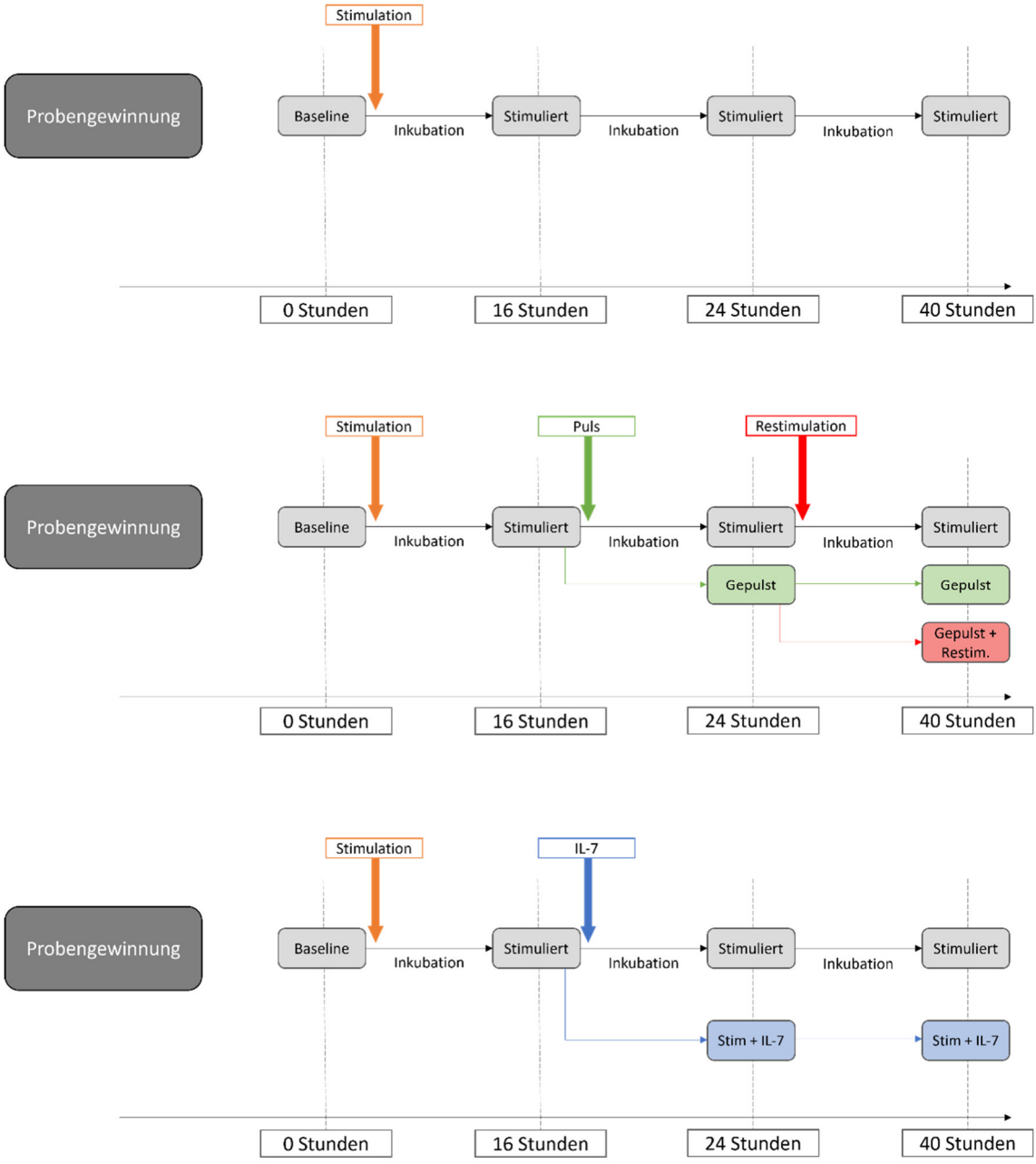


*Abb. 1: **Experimenteller Ablauf.** Messung der oberflächlichen CD127-Expression an vier Zeitpunkten. Durchführung der Stimulation zu Beginn des Experimentes. Oben: Fragestellung 1 Charakterisierung der IL-7Rα-Expression über die Zeit. Mitte: Vergleich stimulierter Proben mit gepulsten Zellen sowie Vergleich nach Restimulation. Unten: Vergleich stimulierter Proben, mit Zellen nach zusätzlicher Inkubation mit IL-7.*

2.2.2 Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials

Für alle Experimente wurde entweder venöses Vollblut von Probanden oder aufbereitete Blutprodukte von Spendern der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf benutzt, um zunächst mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) zu gewinnen und in einem weiteren Schritt Monozyten zu isolieren.

2.2.2.1 Vollblutentnahme von Probanden

Die Entnahme erfolgte venös mithilfe eines *Butterfly*-Systems aus der Armbeuge in heparinisierte Vakuumröhrchen zu einem Volumen von circa 5 ml pro Röhrchen. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutgewinnung gesund. Es bestanden keine chronischen Erkrankungen sowie keine akuten (Erkältungs-) Infektionen. Die Gesamtmenge des verwendeten Blutes betrug circa 30-40 ml pro Spender.

2.2.2.2 Verwendung aufbereiteter Blutspendeprodukte

Alternativ zur Blutentnahme an Probanden wurden aufbereitete, vorzentrifugierte Produkte (*buffy coat*, Leukozytenkonzentrat) benutzt. Diese stammten aus der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf und entstehen als Nebenprodukt bei der Bereitung von Erythrozytenkonzentraten. Die ungerinnbar gemachten Leukozytenkonzentrate enthalten bei einem Volumen von circa 60 ml ungefähr 400-800 Millionen PBMCs.

2.2.3 Verarbeitung des biologischen Untersuchungsmaterials und experimentelle Durchführung

2.2.3.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus venösem Vollblut

Die Isolation der Zellen fand unter sterilen Arbeitsbedingungen statt. Das heparinisierte Blut wurde zu je maximal 25 ml in ein 50 ml *Falcon*-Gefäß überführt und mit PBS (*phosphate buffered saline*) auf Zimmertemperatur (circa 21-23 °C) im Verhältnis 1:2 verdünnt und durch Resuspendieren gleichmäßig vermischt. Dabei wurde ein Pipettierhelfer (*Pipetboy*) mit 25 ml Stripetten verwendet.

Im nächsten Schritt wurde ein weiteres 50 ml *Falcon* mit einem Dichtezentrifugationsmedium auf Saccharose-Basis (Ficoll) bei Zimmertemperatur zu 15 ml befüllt. Mithilfe eines *Pipetboy* konnte ein Volumen von maximal 35 ml des Blut-PBS-Gemisches auf die Ficoll-Phase geschichtet werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Vermischung zwischen beiden Schichten stattfand. Das befüllte 50 ml Falcon wurde fest verschlossen und zentrifugiert (30 min, 1500 rpm, ohne Abbremsfunktion, 21 °C). Durch die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Bestandteile des *Falcon* ergaben sich bei der Zentrifugation verschiedene Phasen (von unten nach oben: erythrozytäre Phase, Ficoll-Phase, Leukozytenphase und Heparin-Blutplasma). Anschließend erfolgte zunächst die Abpipettierung der Leukozytenphase durch Verwendung einer 10 ml Stripette, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde keine Komponenten der Erythrozytenphase mitzupipettieren. Anschließend folgte der Transfer in ein neues 50 ml Falcon.

Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis und mit gekühlten Medien durchgeführt. Die abpipettierten Zellen wurden mit PBS 1:2 verdünnt und erneut zentrifugiert (20 min, 1200 rpm, maximale Bremskraft, 4 °C). Durch die Zentrifugation bildete sich im spitz zulaufenden Grund des *Falcon* ein stabiles Zellpellet. Der Überstand, der auch die Thrombozyten enthielt, wurde verworfen und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde anschließend wiederholt. Danach wurden 3-10 ml MACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration der Zellsuspension und damit auch der absoluten Zellmenge wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. In eine 96-Well-Platte (*U-Bottom*) wurden 195 µl Trypanblau pipettiert. Daraufhin wurden 5 µl der Zellsuspension hinzugegeben, die vorher gründlich zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen resuspendiert wurde.

Durch leichtes Befeuchten wurde ein Deckplättchen auf der Neubauer-Zählkammer befestigt. Nach erneutem Resuspendieren des Wells zur Durchmischung wurden 10 µl entnommen. Die Pipettenspitze wurde an der Grenzfläche zwischen Zählkammer und Deckplättchen aufgesetzt und das Volumen konnte sich zwischen beiden Körpern verteilen.

Die Zählkammer wurde unter dem Mikroskop untersucht. Dabei wurden nacheinander die vitalen mononukleären Zellen jedes Quadranten ausgezählt und addiert. Bei einer Verdünnung von 1:40 (5 µl Zellen bei 195 µl Trypanblau) konnte durch Multiplikation mit dem Faktor 10^5 die Konzentration der PBMCs pro ml festgestellt werden. Durch Multiplikation mit dem Volumen der PBMC-Suspension in ml konnte die Gesamtmenge der isolierten Zellen errechnet werden.

Alle Arbeitsschritte wurden zügig nacheinander durchgeführt. Die Dauer der Isolation inklusive Auszählung der Zellen betrug ungefähr 90 Minuten.

2.2.3.2 Isolation von Monozyten

Die Isolation von CD14- und CD16-positiven Monozyten erfolgte mittels „*EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion*“ des Herstellers *STEMCELL Technologies* nach dem Prinzip der magnetisch aktivierten Zellsortierung (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS). In diesem Rahmen werden zunächst alle Immunzellen außer den gewünschten Monozyten durch eine Antikörpermischung markiert und magnetisch entfernt, wodurch lediglich die gewünschte Zellpopulation unberührt übrig bleibt (Negativselektion). Bei der Verwendung des Kits wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Eine Gesamtmenge von $5x10^7$ vorher isolierter PBMCs in 250 µl Isolationsmedium (PBS mit 2% FBS und 1 mM EDTA) wurde in einem 5 ml Falcon-Tube

resuspendiert. 25 µl des vom Hersteller bereitgestellten „*EasySep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail without CD16 Depletion*“ wurden hinzugegeben und die Zellsuspension mittels Vortexmischer sorgfältig vermischt. Im Anschluss folgte eine Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Nach sorgfältigem Vortexen der „*EasySep™ Magnetic Particles*” wurden 25 µl zur Zellmischung hinzugegeben. Erneut wurde gründlich mittels Vortexer durchmischt und bei Raumtemperatur folgte eine weitere Inkubationszeit für 15 Minuten. Isolationsmedium wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 2,5 ml hinzugefügt und der Inhalt des *Falcon*-Tubes dreimal vorsichtig resuspendiert. Ohne weitere Manipulation wurde das *Falcon-Tube* in einem Magnet (*EasySep™ Magnet*) platziert und dort für 2,5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Ohne das *Falcon-Tube* aus dem Magnet zu entfernen wurde der Inhalt mittels einer einzigen fließenden Bewegung in ein 15 ml *Falcon-Tube* überführt. Um auf die für das Experiment benötigte Zellzahl zu kommen wurde dieser Schritt zweimal parallel durchgeführt, sodass sich ein Endvolumen von 5 ml ergab. Zuletzt wurde die Konzentration der isolierten Zellen mittels Neubauer-Zählkammer, wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben, bestimmt. Zur weiteren Verwendung im Experiment wurden die isolierten Monozyten in Makrophagen-Medium (88% RPMI 1640 Medium, 1% L-Glutamin, 1% HEPES, 10% FCS) überführt.

Für jede zu untersuchende Probe sollten 100 µl in ein Well gegeben werden, mit einer Zellzahl von 50.000 Zellen pro Well. Daher sollte die Monozyten-Suspension im nächsten Schritt auf eine Zielkonzentration von 0,5 x 10^6 Zellen/ml mittels folgender Formel gebracht werden:

$$Volumen\,(V) = Zellzahl\,(N) \div Konzentration\,(c)$$

Abschließend wurden die Zellen in die entsprechenden Wells einer *U-Bottom*-96-Well-Platte pipettiert. Für jede Probe gab es ein identisches Duplikat. Der Aufbau dieser Platten ist an dieser Stelle beispielhaft illustriert:

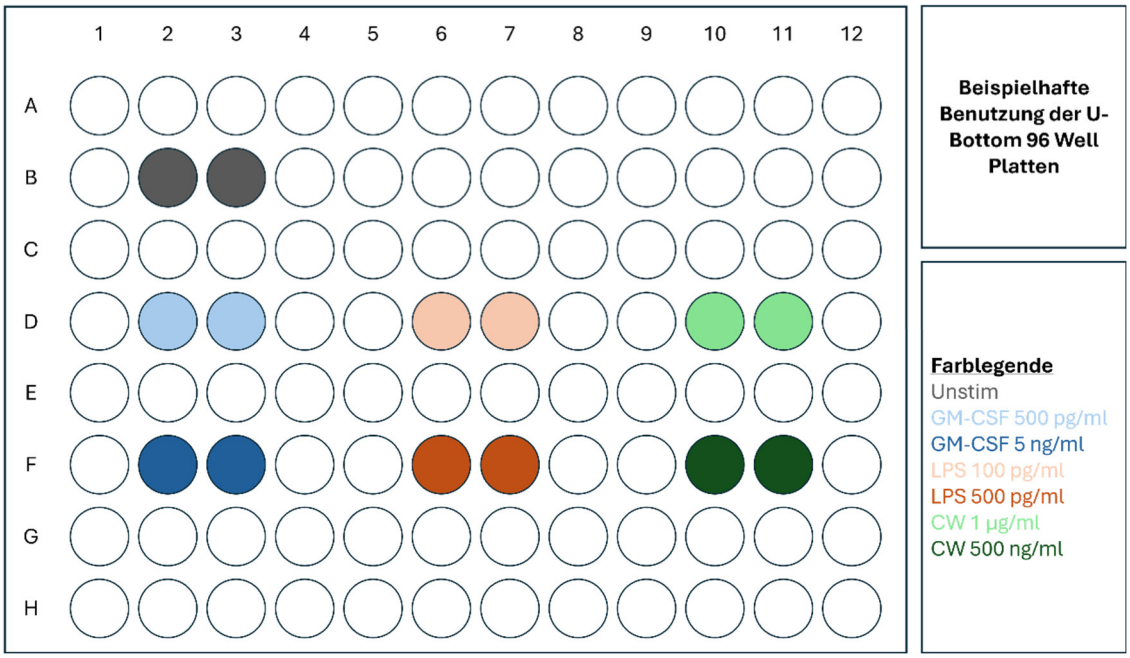


Abb. 2: ***Beispielhafte Darstellung für die Beimpfung der U-Bottom-96-Well-Platten.*** *Das Gesamtvolumen pro Well betrug 200 µl. Dieses Volumen setzte sich aus 100 µl Zellpräparation und 100 µl Stimulationsmix zusammen.*

2.2.3.3 Stimulation

Insgesamt wurden die Monozyten mit drei verschiedenen Substanzen stimuliert: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (bezeichnet als GM-CSF), Lipopolysaccharid (bezeichnet als LPS) und Bestandteile mykobakterieller Zellwände von M. tuberculosis (bezeichnet als CW). Gleichzeitig wurden auch immer unstimulierte Kontrollen inkubiert. Für jeden Stimulus wurden zwei verschiedene Konzentrationen angewendet, die in der Folge aufgelistet sind:

Stimulus	**Konzentration 1**	**Konzentration 2**
GM-CSF	5 ng/ml	500 pg/ml
LPS	500 pg/ml	100 pg/ml
CW	1 µg/ml	0,5 µg/ml

Tabelle 8: ***Auflistung der verwendeten Stimuli.***

Diese Konzentrationen waren das Ergebnis aus Vorexperimenten, in denen Konzentrationen ermittelt wurden, die im experimentellen Zeitraum nicht letal auf die zu untersuchenden Zellen wirkten, die jedoch in der Lage waren, einen biologischen Effekt auszuüben.

Zunächst wurde mittels der verfügbaren *Stock*-Lösung und mittels Makrophagen-Medium durch Verdünnung ein *Master-Mix* für jede Substanz und jede Stimulation hergestellt. Dieser *Master-Mix* musste mehreren Ansprüchen genügen:

1. Die Menge der hergestellten Lösung sollte für alle zu stimulierenden Proben ausreichen und eine Sicherheitsreserve beinhalten
2. Da die Zellen nicht direkt im *Master-Mix* inkubiert werden konnten, sondern die Zellsuspension und der Stimulus-Mix im Volumenverhältnis 1:1 vermischt wurden, musste die Konzentration des Mixes der doppelten Zielkonzentration entsprechen

Berechnet wurden die verschiedenen Konzentrationen mittels der Verdünnungsformel:

$$C1\ x\ V1\ =\ C2\ x\ V2\ (C\ =\ Konzentration;\ V\ =\ Volumen)$$

In jedes Well wurden entsprechend der Versuchsbedingungen 100 µl des Stimulationsmixes pipettiert und die Zelllösung vorsichtig resuspendiert.

2.2.3.4 Inkubation

Die Platten wurden in den randständigen Wells mit PBS-Puffer aufgefüllt, um im warmen Milieu des Inkubators ein Austrocknen zu vermeiden. Anschließend wurde der Deckel der Well-Platte aufgesetzt und die Zellen bei 37 °C in den Inkubator gestellt.

2.2.3.5 Entfernen des Stimulus durch Pulsen der Zellen

Nach 16 Stunden wurden die Zellen aus dem Inkubator genommen und bei 4 °C und 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Die nächsten Schritte erfolgten auf Eis: der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und anschließend erneutes Medium mit oder ohne Zusatz von IL-7 und dem entsprechenden Stimulus, beziehungsweise mit oder ohne Zusatz des identischen Stimulus hinzugegeben. Die Proben wurden sorgfältig resuspendiert und erneut bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.6 Stimulation mit IL-7

Die Stimulation mit IL-7 erfolgte unter den in **2.2.3.3** beschriebenen Bedingungen, die Zielkonzentration von IL-7 betrug 10 ng/ml; die Konzentration wurde in Vorversuchen bestimmt.

2.2.3.7 Restimulation der Zellen

Zur Restimulation der Zellen nach 24 Stunden wurden für alle Stichproben die exakt identische Konzentration des Stimulus verwendet, die auch initial schon zum Einsatz gekommen war. Wie in **2.2.3.3** beschrieben, wurden zunächst die Überstände nach einem Zentrifugationsschritt (4 °C, 1200 rpm, 5 min) entfernt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Stimulationsmixes und die erneute Inkubation.

2.2.4 Verwendung des Durchflusszytometers LSR Fortessa

2.2.4.1 Färbung als Vorbereitung für die Messung

Die Zubereitung für den Antikörper-Mix sollte insgesamt 5 µl pro Well betragen und setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

Bestandteil	**Menge pro Well**	**Fluorochrom**
Viability dye	0,5 µl	e780
CD14	0,5 µl	BV650
HLA-DR	0,5 µl	BV786
CD40	0,1 µl	AF488
CD16	0,1 µl	APC
CD127	0,1 µl	AF700
MACS-Puffer	3,2 µl	-

Tabelle 9: ***Einzelne Bestandteile des verwendeten Antikörper-Mixes.***

Der Antikörper-Mix musste für insgesamt 114 Well angesetzt werden. Inklusive Reserve wurden immer Mengenangaben auf 140 Well gerechnet.

Die Well-Platten mit den entsprechenden Zellen wurden aus dem Inkubator entnommen und anschließend wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen am Well-Boden hafteten. Die Proben wurden außerdem auf Veränderungen des Mediums sowie auf Anzeichen für Verunreinigungen überprüft. Im Anschluss wurden 180 µl des Überstandes entfernt, wobei darauf geachtet wurde mit der Pipettenspitze nicht den Boden des Wells zu berühren und 200 µl MACS-Puffer pro Well hinzugefügt. Nach einer Inkubationsphase von 15 Minuten auf Eis folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 1200 rpm. 180 µl des MACS-Puffers wurden danach ebenso vorsichtig entfernt, wie bereits weiter oben beschrieben. Anschließend wurden 5 µl des Antikörper-Mixes hinzugegeben und die Wells sorgfältig etwa 50-mal resuspendiert. Im nächsten Schritt folgte eine 30-minütige Inkubationsdauer, in der die Zellen lichtgeschützt auf Eis gelagert wurden. Die Zellsuspension wurde mit weiteren 160 µl MACS aufgefüllt und erneut für fünf Minuten bei 4 °C auf 1200 rpm zentrifugiert. Es folgte eine weitere, vorsichtige Abnahme des Überstandes, die Zugabe von 70 µl MACS-Puffer, ein erneutes, intensives Resuspendieren und schließlich der Transfer des Inhaltes eines Wells in ein Mikrodilutions-*Tube*, welches in ein FACS-Röhrchen *(Fluorescence activated cell sorting)* eingelegt wurde und anschließend gründlich mittels Vortexmischer gemischt wurde. Darauf wurde die Probe mit dem Durchflusszytometer LSR Fortessa gemessen.

Für die Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometrie zwei verschiedene Parameter in Bezug auf die Expression von CD127 ermittelt. Mit der *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) wird die relative Helligkeit der gemessenen Zellen für das spezifische Fluorochrom bestimmt. Nach Zugabe eines Antikörpers für die zu untersuchende Zielstruktur, der mit einem Farbstoff gekoppelt ist, korreliert die MFI mit der Expression des Zielproteins auf der Oberfläche der Zelle. Die *Frequency of Positives* (FoP) beschreibt in diesem Kontext den prozentualen Anteil an Monozyten, die auf ihrer Oberfläche den IL-7Rα exprimieren.

2.2.4.2 Reinheit der Proben

Für jedes Experiment wurde nach Isolierung der Zellen die Reinheit der Monozyten bestimmt. Dafür wurden sowohl die PBMCs als auch die isolierten Monozyten durchflusszytometrisch gemessen. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach oben geschildertem Ablauf. Der Antikörper-Mix setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Bestandteil	**Menge**	**Antikörper-Farbe**
MACS-Puffer	32 µl	-
CD14	5 µl	Bv650
HLA-DR	5 µl	Bv786
Via	5 µl	e780
CD16	1 µl	APC
CD127	1 µl	AF700
CD40	1 µl	AF488

Tabelle 10: ***Mengenzusammensetzung des Antikörper-Mixes.***

Insgesamt ergab sich dadurch ein Volumen von 50 µl. Pro zu überprüfendes Well wurden auch hier wieder 5 µl verabreicht. Die Reinheit wurde als ausreichend bewertet, wenn der Monozytenanteil bei einem Wert >85% lag. In Abbildung 3 ist exemplarisch das Vorgehen beim *Gating* der Monozyten dargestellt, an dem sich auch die Bestimmung der Reinheit orientierte.

2.2.5 Auswertung

2.2.5.1 Auswertung mit FlowJo

Die Auswertung der in der Durchflusszytometrie erhobenen Daten erfolgte für alle gemessenen Stichproben als Messung der *Frequency of Positives* (FoP, prozentualer Anteil positiver Zellen) und der *Mean Fluorescence Intensity* (MFI; mittlere Fluoreszenzintensität). Für alle durchgeführten Experimente erfolgte eine einheitliche *Gating*-Strategie, die exemplarisch in Abbildung 4 illustriert ist. Die Auswahl von

Monozyten erfolgte zunächst im FACS-*Plot* anhand der Parameter *Forward-Scatter-Area* (FSC-A) und *Side-Scatter-Area* (SSC-A) durch Platzierung eines *Gating*-Fensters auf die Monozyten-Population. Die ausgewählten Zellen wurden im nächsten Schritt mittels Verwendung von *Forward-Scatter-Area* und *Forward-Scatter-Height* (FSC-H) untersucht, um spezifisch Einzelzellen auszuwählen und aneinanderhaftende Zellen (Zellaggregate) auszuschließen. Anschließend erfolgte eine Viabilitätsüberprüfung der Zellen durch Zugabe eines Viabilitätsfarbstoffes (Via), der lediglich Zellen mit nicht-intakten Membranen anfärbt und sichtbar macht. Zudem wurde HLA-DR als Marker für Monozyten verwendet. Via-negative Zellen und HLA-DR-positive Zellen wurden ausgewählt und für die weiteren Analysen als Grundpopulation herangezogen.

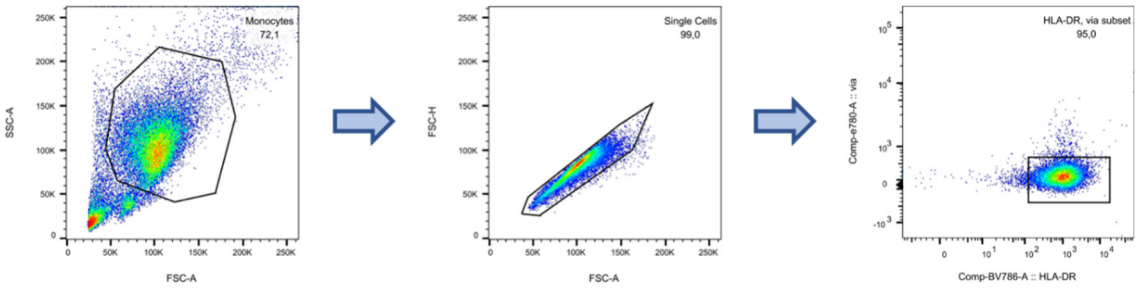


Abb. 3: ***Gating Strategie.*** *Links: FSC-A gegen SSC-A zur Ermittlung der mononukleären Zellen, Mitte: FSC-A gegen FSC-H zum Gating der singulären Zellen, rechts: HLA-DR gegen Via zum Detektieren der lebenden Monozyten (Via-negativ, HLA-DR-positiv).*

Zur weiteren Auswertung wurden die selektierten Zellen sowohl auf die Expression des Zielparameters CD127 untersucht als auch auf die Expression von CD40 als Positivkontrolle. Abbildung 4 veranschaulicht ebenfalls exemplarisch das Setzen der jeweiligen *Gating*-Fenster. Diese wurden bei unstimulierten Proben gesetzt und auf die Proben übertragen, die im Verlauf nach Stimulation gemessen wurden. Beim Positionieren der *Gating*-Fenster wurde jeweils angenommen, dass sowohl CD40, als auch CD127 auf frisch isolierten und unstimulierten Monozyten lediglich in geringem Ausmaß exprimiert werden, diese also weitgehend negativ für diese Marker sind.

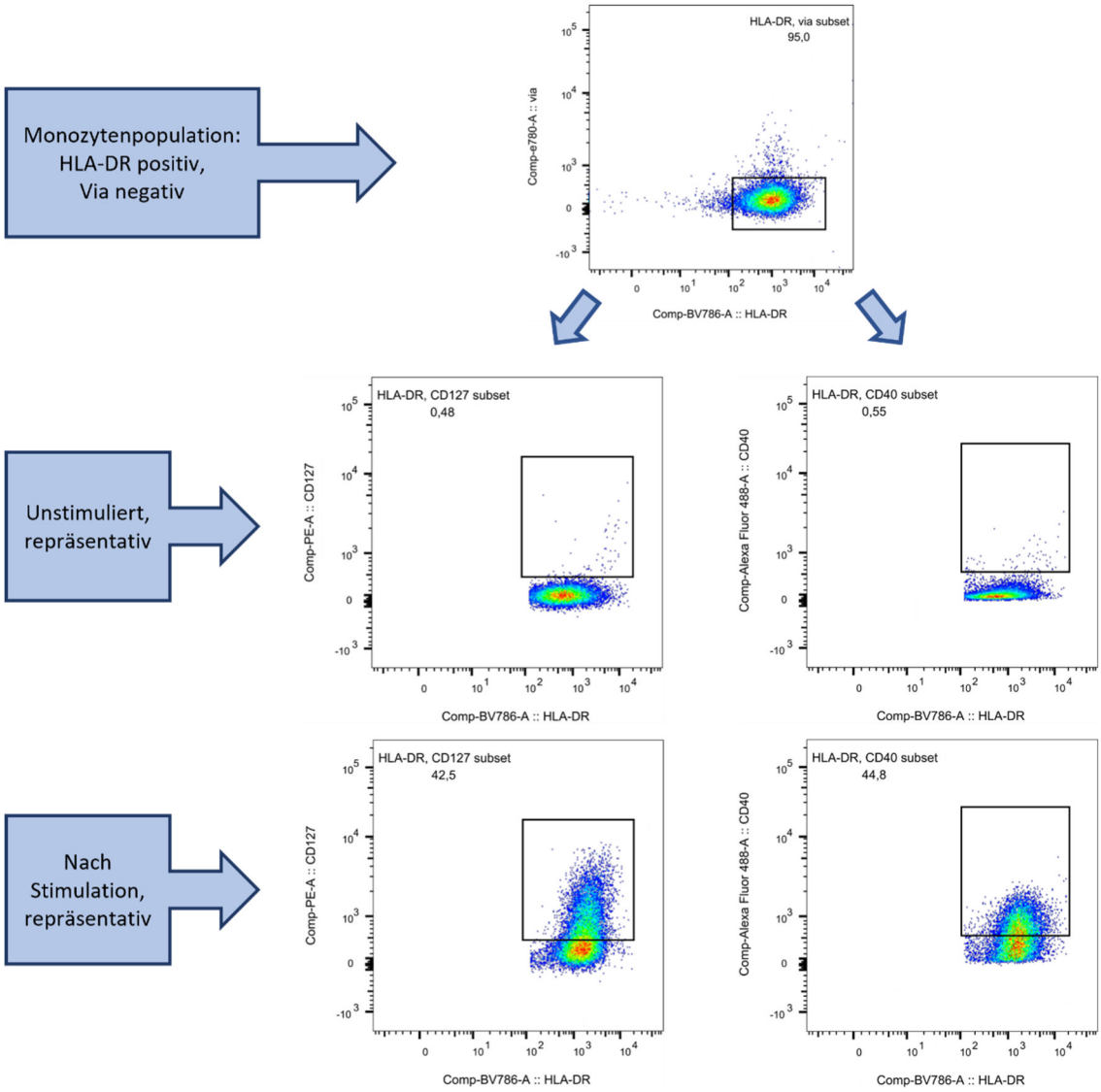


Abb. 4: ***Gating-Strategie.*** *Aus der Monozytenpopulation wurde im weiteren Verlauf die Expression von CD127 bestimmt (links) sowie die Expression von CD40 (rechts). Die Gates wurden aus den unstimulierten Proben auf die stimulierten Proben übertragen. Obere Abbildungen aus unstimulierten Proben, untere aus stimulierten Proben.*

2.2.5.2 Auswertung mit Microsoft Excel

Die mittels FlowJo prozessierten Daten wurden in Microsoft Excel gesammelt und geordnet. Bei Verwendung von technischen Duplikaten wurde der Mittelwert der beiden Einzelergebnisse gebildet und für die weitere Auswertung verwendet. In lediglich zwei Fällen lag nur ein einzelner Messwert vor, in beiden Fällen wurde entschieden diesen einzelnen Wert zu benutzen (zwei Well aus insgesamt 570 Well; bei Experiment 31 – „03_d1 late without IL7_11_CW 1 ug_029.fcs“, wurde kein Antikörper-Mix hinzugefügt; bei Experiment 33 – „03_d1 late without IL7_02_unstim_020.fcs“, fand eine fehlerhafte Überführung in das FACS-Tube statt). Für die graphische Darstellung wurde aus den Werten der fünf Experimente der Median sowie die 25. und die 75. Perzentile berechnet.

2.2.5.3 Auswertung mit GraphPad-Prism

Die Erstellung der Graphen erfolgte mit GraphPad-Prism 10.6.1. Dazu wurden die Ergebnisse aus den Excel-Tabellen importiert. Die Expression von CD127 und CD40 über den Zeitverlauf wurde mittels *connected scatter plots* dargestellt. Bei der Annahme nicht-parametrischer Verteilung der Daten wurde sich hier für die Darstellung des Medians mit der 25. und der 75. Perzentile entschieden.

2.2.5.4 Statistische Auswertung mit SPSS

Die Durchführung der statistischen Auswertungen erfolgte mittels SPSS (Version 31.0.0.0). Aufgrund der geringen Stichprobe (n=5) wurde auf eine Testung der Normalverteilung verzichtet und die Daten mittels nichtparametrischer Verfahren ausgewertet. Bei voneinander abhängigen Variablen wurde der *Wilcoxon signed-rank test* mit einem Signifikanzniveau von $p<0,05$ als zweiseitiger Test verwendet.

2.2.6 Ethikantrag

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente liegt das Ethikvotum „2019-423-KFogU“ vor.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich unterschiedlicher Stimuli zur Induktion der IL-7R-Expression im Zeitverlauf

Nach Stimulation mittels GM-CSF, LPS und CW in jeweils zwei Konzentrationen wurde die Expression des IL-7Rα auf den Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In Abbildung 5 wird der zeitliche Verlauf der IL-7Rα-Expression für die jeweiligen Stimuli gezeigt. Die Kontrollgruppe (unstimulierte Proben) ist zum Vergleich ebenfalls dargestellt. Nach Stimulation mit GM-CSF konnte nach 16 Stunden eine geringe (Stimulation durch 500 pg/ml) bis moderate (5 ng/ml) Zunahme der IL-7Rα-Expression beobachtet werden. Nach 24, bzw. 40 Stunden Stimulation nahm der Anteil der CD127-positiven Zellen ab und näherte sich der Kontrollgruppe. Die Stimulation mit LPS in der Konzentration von 500 pg/ml führte zu der höchsten Zunahme an IL-7Rα-positiven Zellen unter allen verwendeten Stimuli. Diese konnte schon nach 16 Stunden festgestellt werden (Median [LPS]: 70,85%, Median [Kontrolle]: 0,61%) und blieb über den weiteren Zeitverlauf relativ konstant (Median circa 60-65%). Nach der Stimulation mit CW konnte eine zügige Hochregulation für CD127 nach 16 Stunden beobachtet werden sowie eine langsamere Zunahme über den weiteren Zeitverlauf. Nach Stimulation sowohl mit LPS als auch mit CW war der Anteil der IL-7Rα-positiven Zellen zu jedem gemessenen Zeitpunkt über dem der unstimulierten Kontrolle.

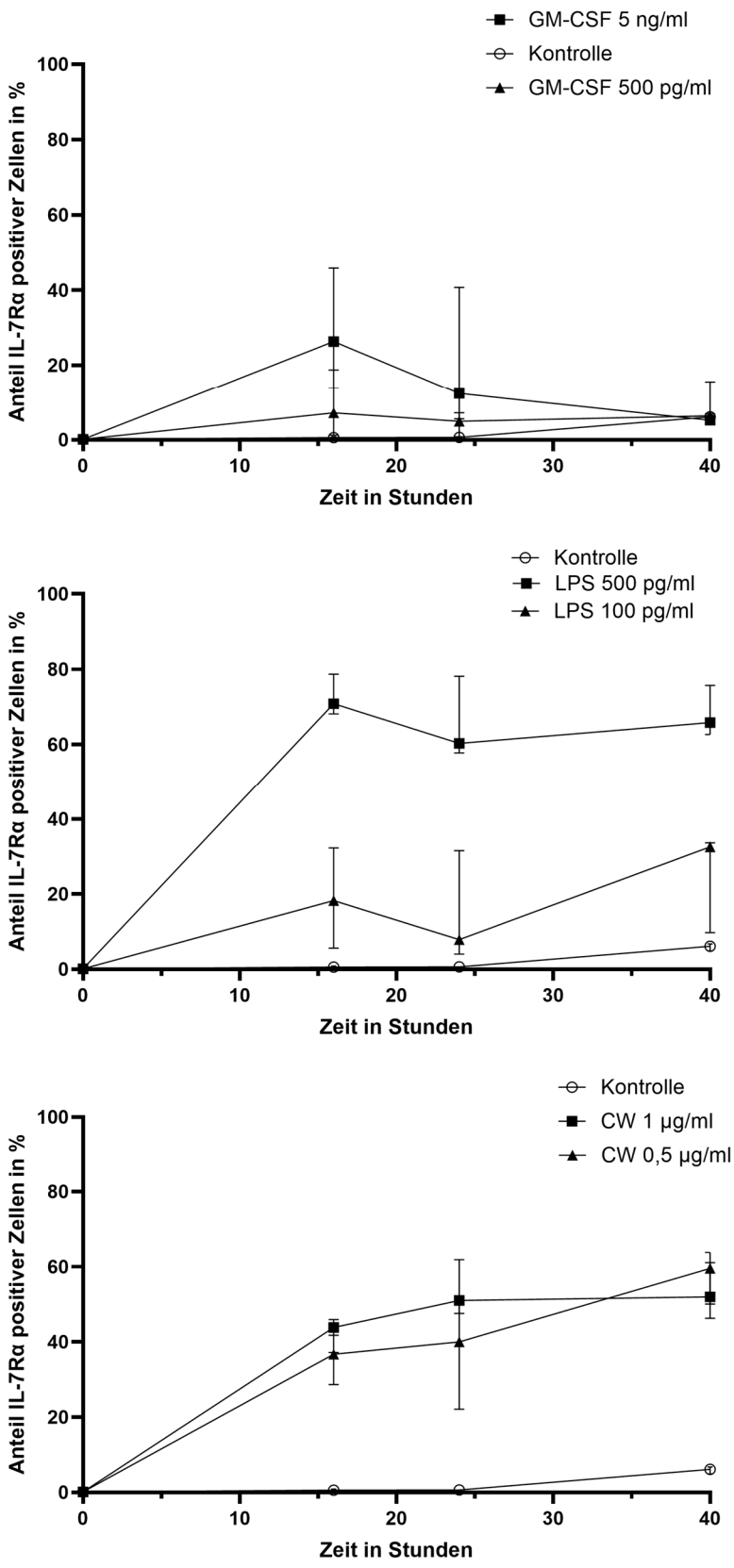


Abb. 5: ***IL-7Rα-Expression auf Monozyten über den Zeitverlauf.*** *Stimulation mit GM-CSF (oben), LPS (Mitte) und CW (unten) in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Auf der y-Achse ist der Anteil an IL-7Rα-positiven Zellen dargestellt, auf der x-Achse die Zeit in Stunden.*

Die Messungen erfolgten zu vier verschiedenen Zeitpunkten (nach 0 Stunden, 16 Stunden, 24 Stunden und 40 Stunden). Darstellungen der Mediane sowie der 25. und der 75. Perzentile, n=5. Diese Abbildung basiert auf bereits publizierten Daten (Harelimana, Ahor et al. 2022), die im Rahmen dieser Dissertation neu ausgewertet und dargestellt wurden.

Insbesondere für GM-CSF wurde eine starke Streuung der CD127-Expression in den einzelnen Experimenten festgestellt. Abbildung 6 zeigt exemplarisch *Gatings* für GM-CSF aus zwei unterschiedlichen Versuchen. Während bei einigen Versuchen eine starke Zunahme der IL-7Rα-Expression festgestellt werden konnte, zeigte sich in anderen so gut wie keine Veränderung nach Stimulation.

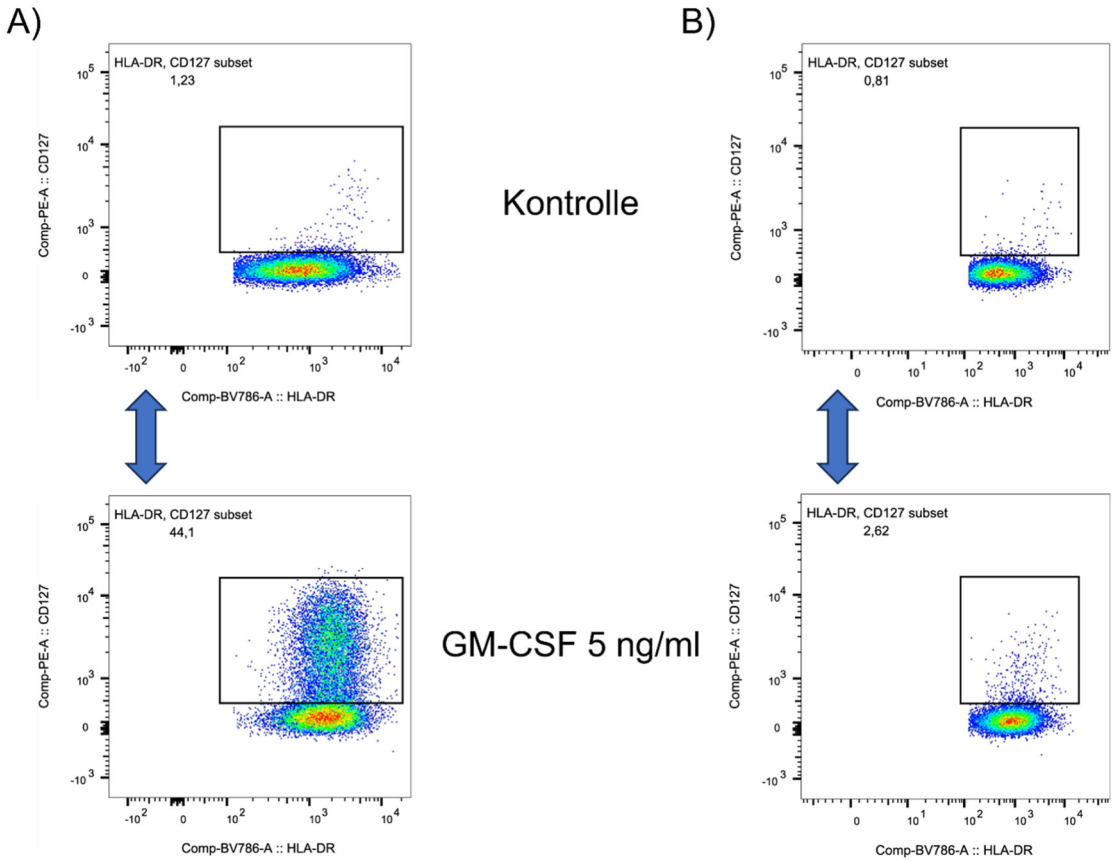


*Abb. 6: **Streuung der CD127-Expression nach GM-CSF-Stimulation.** Dargestellt sind Gating-Fenster aus zwei unterschiedlichen Experimenten, bei denen die Kontrolle und GM-CSF-stimulierte Zellen gegenübergestellt werden. **A)** Zunahme der CD127-Expression nach Stimulation durch GM-CSF. **B)** Geringfügige Veränderung der CD127-Expression nach Stimulation mit GM-CSF.*

Um festzustellen, ob die verwendeten Stimuli konzentrationsabhängige Titrationseffekte aufwiesen, wurde nach 16 Stunden der Anteil der IL-7Rα-positiven Zellen zwischen den Konzentrationen verglichen (Abbildung 7). Dabei zeigte sich für alle drei Stimuli nach 16 Stunden in allen durchgeführten Experimenten ein höherer Anteil IL-7Rα-exprimierender Zellen bei der jeweils höheren Konzentration. LPS wies dabei die größte Differenz

zwischen den Konzentrationen auf, während sich die Werte für GM-CSF und CW im Zeitverlauf annäherten.

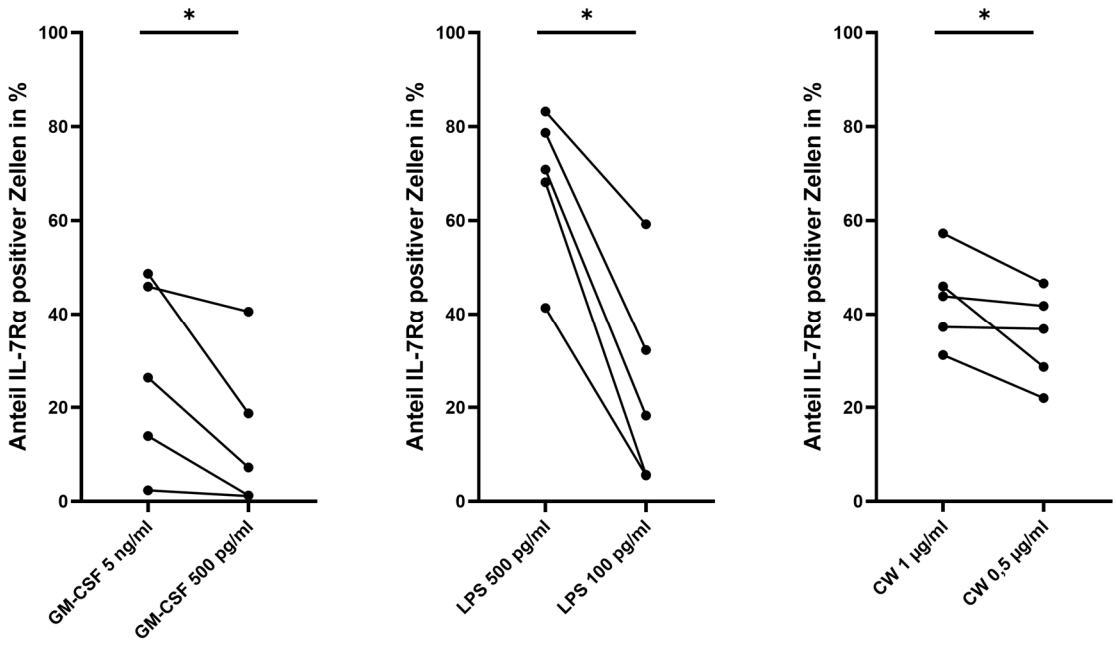


Abb. 7: ***Vergleich der unterschiedlichen verwendeten Konzentrationen eines Stimulus nach 16-stündiger Stimulation.*** *Jeder Punkt repräsentiert ein Experiment, n=5. Die abhängigen Versuchspaare sind über Linien verbunden. Von links nach rechts: GM-CSF (**p=0,043**), LPS (**p=0,043**), CW (**p=0,043**).*

3.2 Expression des IL-7Rα nach Entfernung des Stimulus sowie nach Restimulation

Nachdem festgestellt wurde, dass durch Stimulation eine andauernde Hochregulation des IL-7Rα induziert werden konnte, sollte untersucht werden, ob diese Hochregulation abhängig von der dauerhaften Anwesenheit eines Stimulus ist. Dazu wurde die stimulierende Substanz nach der initialen Hochregulation durch einen Wechsel des Mediums entfernt. Nach einer weiteren Inkubationsphase wurde die CD127-Expression der gepulsten Monozyten (nach Entzug des Stimulus) mit Monozyten verglichen, die weiterhin unter dauerhafter Stimulation standen. In Abbildung 8 sind die zeitlichen Verläufe nach Stimulusentzug für GM-CSF, LPS und CW dargestellt.

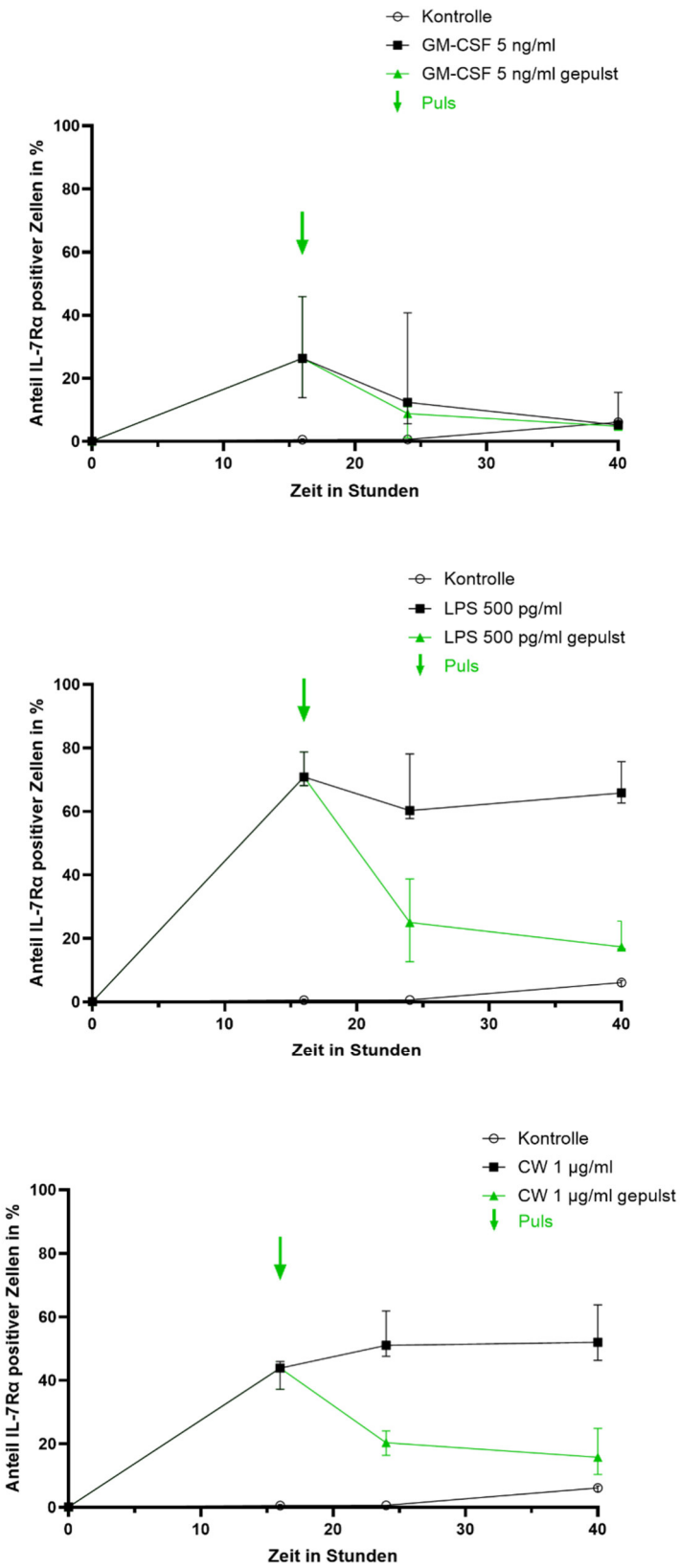


Abb. 8: ***Zeitverlauf der IL-7Rα-positiven Zellen nach Puls.*** *Stimulusentzug nach 16 Stunden. Von oben nach unten: GM-CSF 5 ng/ml, LPS 500 pg/ml, CW 1 µg/ml. n=5, Darstellung der Mediane sowie der 25. und der 75. Perzentile. Diese Abbildung basiert auf bereits publizierten*

Daten (Harelimana, Ahor et al. 2022), die im Rahmen dieser Dissertation neu ausgewertet und dargestellt wurden.

Während bei GM-CSF ein geringer Unterschied zwischen gepulsten und nicht-gepulsten Proben beobachtet werden konnte, nahm der Anteil an CD127-positiven Monozyten bei Entzug von LPS und von CW deutlich ab. Dieser Effekt war bereits 8 Stunden nach Entzug (24 Stunden im Experiment) zu beobachten und nahm im zeitlichen Verlauf geringfügig zu. In Abbildung 9 ist die Gegenüberstellung von gepulsten und nicht gepulsten Proben nach 24 Stunden Versuchsdauer dargestellt.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Veränderungen in der Expression von CD127 auf eine verminderte Aktivierung nach Entfernung des Stimulus zurückzuführen sind, wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD40 untersucht. Nach Entfernung des Stimulus zeigte sich ein weiterer Anstieg der CD40-Expression im Gegensatz zur CD127-Expression, die sowohl nach 24 Stunden als auch nach 40 Stunden Messung abnahm. Die entsprechenden Graphen sind im Anhang dargestellt.

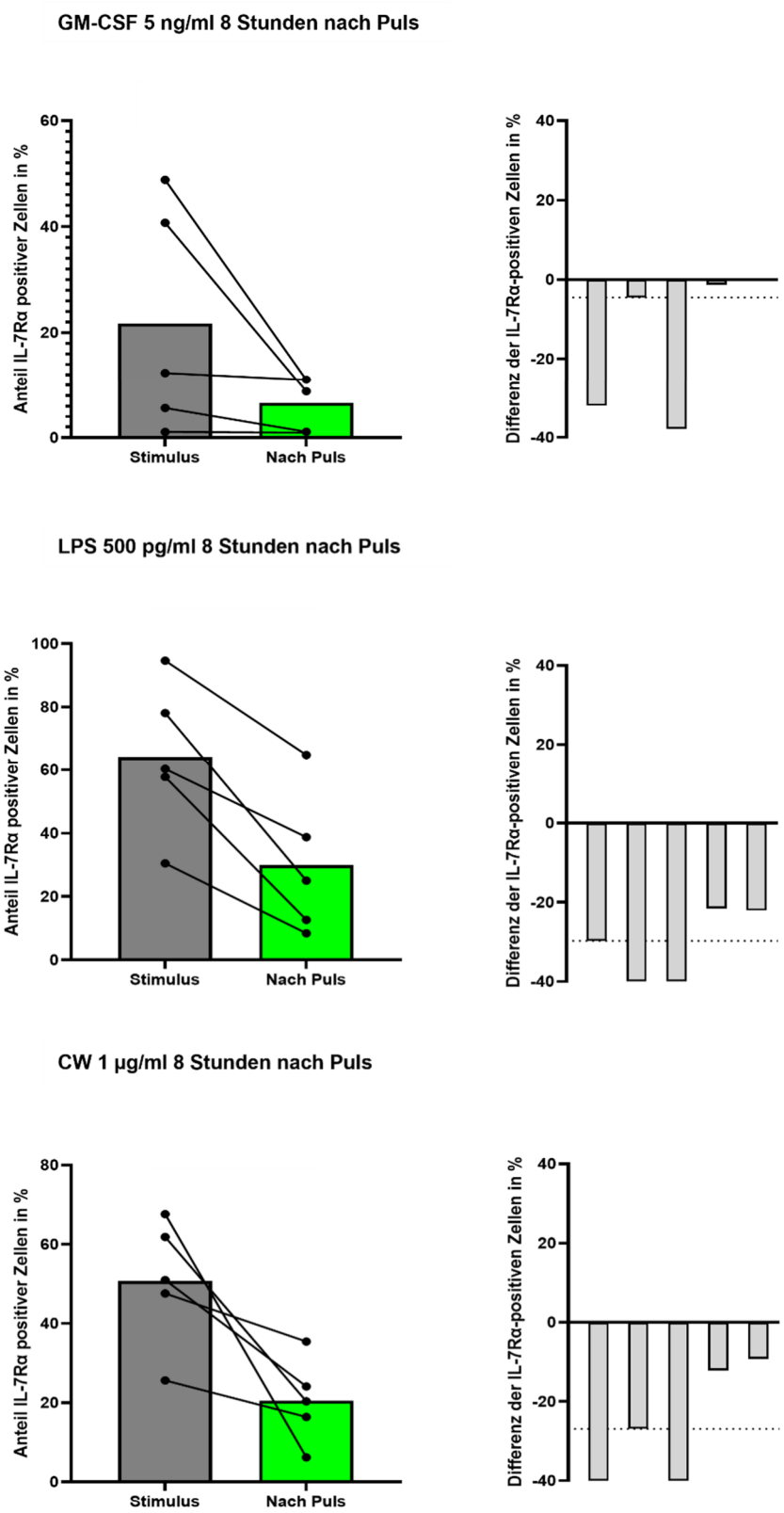


Abb. 9: ***Reduktion der IL-7Rα-positiven Zellen nach Puls.*** *Links: Mediane der IL-7Rα-positiven Monozyten unter Stimulation und nach Puls. Jeder Punkt repräsentiert ein Experiment. Verbundene Linien stellen abhängige Proben dar. Rechts: Differenz des Anteils an IL-7Rα-positiven Zellen. Jeder Balken repräsentiert ein Experiment. Gestrichelte Linie: Median der Differenzen.*

Nach der beobachteten Runterregulation des IL-7Rα durch Unterbrechung der Stimulation wurde im Anschluss geprüft, ob eine Restimulation auch zu einer erneuten Rezeptorexprimierung führen kann. Gepulste Zellen wurden dafür erneut mit dem gleichen Stimulus in der gleichen Konzentration stimuliert und nach 16-stündiger Inkubation wurde erneut die CD127-Expression bestimmt. In Abbildung 10 ist der Zeitverlauf für die drei verwendeten Stimuli nach Puls, beziehungsweise Restimulation dargestellt.

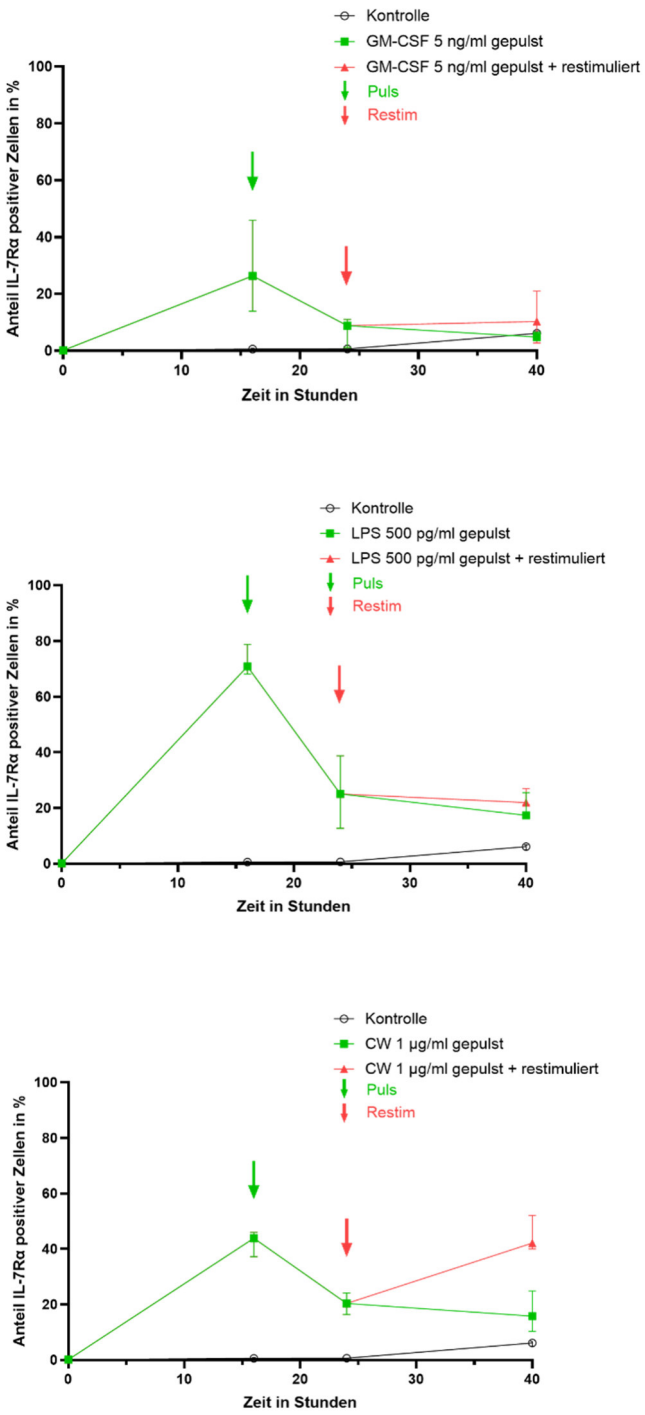


Abb. 10: ***Prozentualer Anteil an IL-7Rα-positiven Monozyten nach Puls und Restimulation.*** *Von oben nach unten: GM-CSF, LPS und CW. n=5, Darstellung der Mediane sowie der 25. und der 75. Perzentile.*

Während nach Restimulation mit GM-CSF und LPS keine deutlichen Unterschiede in der prozentualen Expression von CD127 gegenüber gepulsten Zellen gezeigt werden konnten, unterschieden sich die Proben nach Restimulation mit CW deutlich von den gepulsten Proben. Tabelle 11 zeigt die *FoP*-Werte der einzelnen Experimente sowie die Differenzen zwischen restimulierten und gepulsten Messungen.

Experiment	FoP nach Restimulation	FoP nach Puls	Differenz der FoP
1	31,35%	4,50%	26,85%
2	40,00%	10,35%	29,65%
3	56,65%	24,85%	31,80%
4	42,10%	15,80%	26,30%
5	52,05%	36,80%	15,25%

*Tabelle 11: **FoP-Werte für CW 1 µg/ml.** FoP der jeweiligen Experimente nach Puls und nach Restimulation sowie Differenz der FoP nach 40 Stunden.*

In jedem der durchgeführten Experimente zeigte sich nach Restimulation mit CW 1 µg/ml auch ein prozentualer Anstieg der Zellen, die den IL-7Rα exprimierten (*Wilcoxon signed-rank test* mit **p=0,043**; Median der Differenzen: 26,85%).

3.3 Einfluss von IL-7 auf den Expressionsverlauf

Die letzte Fragestellung befasste sich mit der Untersuchung der Effekte durch die zusätzliche Inkubation mit IL-7 auf die IL-7-Rezeptorexpression auf Monozyten. Nachdem nach 16 Stunden eine Erhöhung der CD127-Expression beobachtet werden konnte, erfolgte die Zugabe von IL-7 in das stimulushaltige Medium. Der Verlauf der IL-7Rα-Expression mit IL-7-Zusatz und ohne IL-7-Zusatz ist für alle drei Stimuli in Abbildung 11 dargestellt.

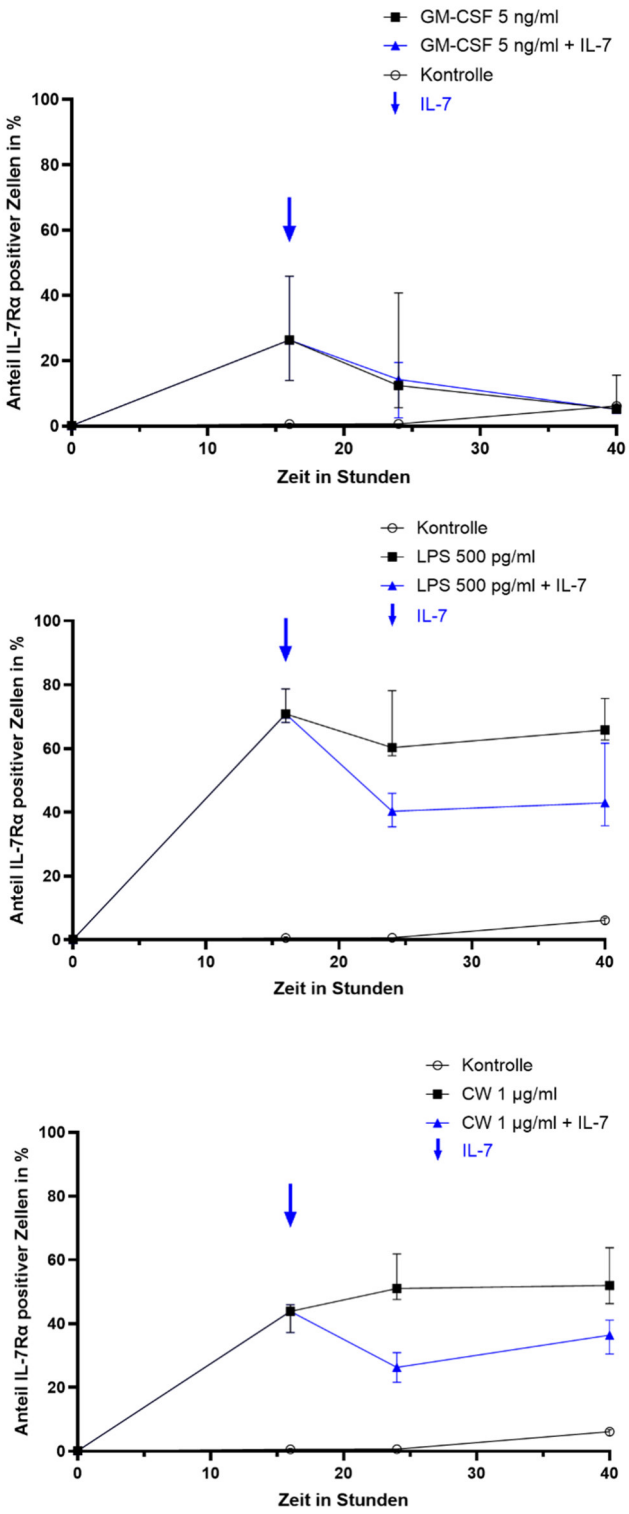


Abb. 11: ***Prozentualer Anteil an IL-7Rα-positiven Monozyten mit und ohne zusätzliche IL-7-Inkubation.*** *Von oben nach unten: GM-CSF, LPS und CW. n=5, Darstellung der Mediane sowie der 25. und der 75. Perzentile.*

Für LPS und CW zeigten sich nach Inkubation mit IL-7 Reduktionen im Anteil der CD127-exprimierenden Zellen. Dieser Effekt war sowohl 8 als auch 24 Stunden nach Zugabe von IL-7 zu beobachten und konnte für jedes durchgeführte Experiment gezeigt werden

(Abbildung 12). Bei mit GM-CSF stimulierten Proben wurde kein Effekt durch IL-7 beobachtet.

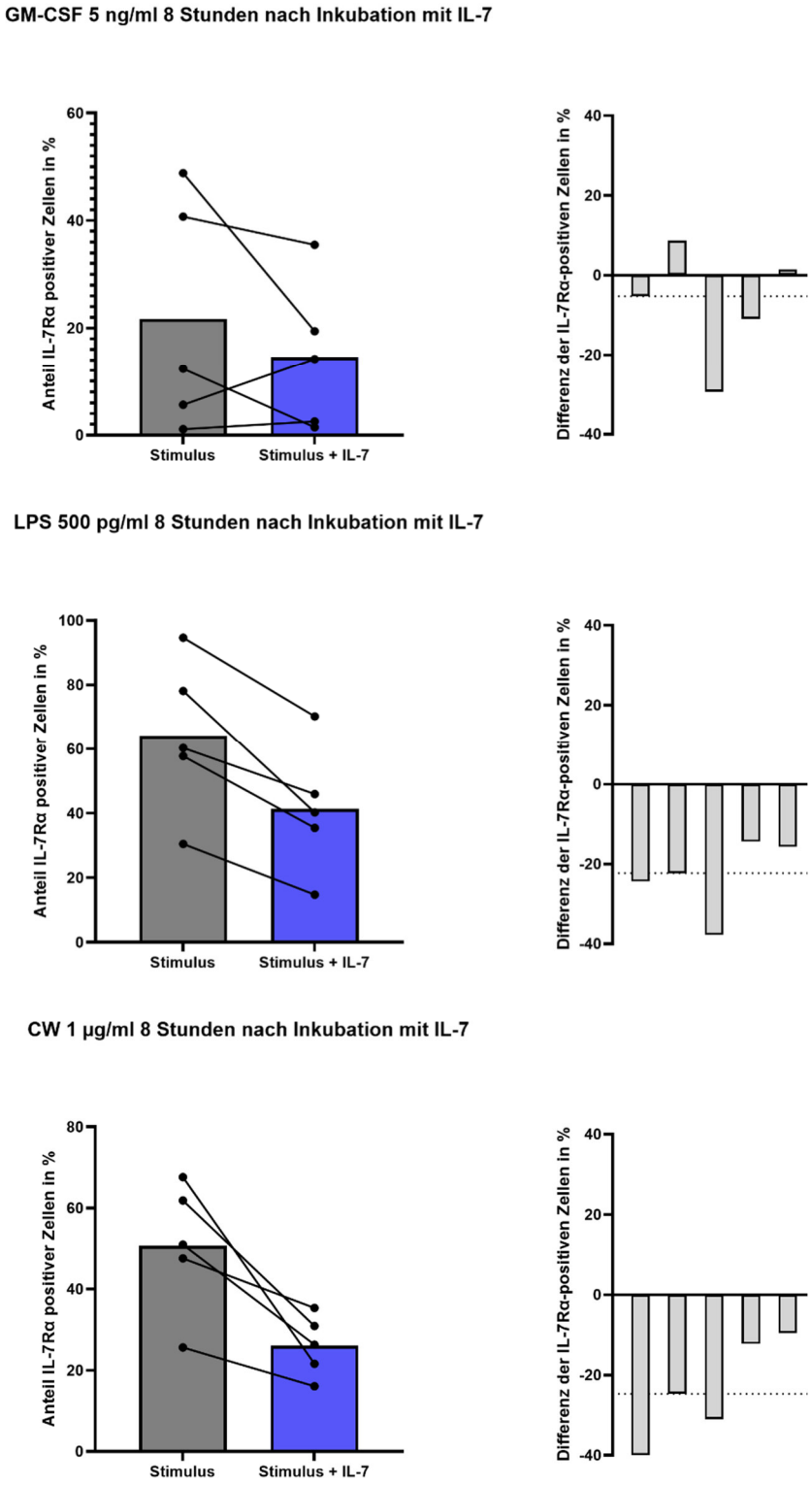


Abb. 12: ***Reduktion der IL-7Rα-positiven Zellen nach Inkubation mit IL-7.*** *Links: Mediane der IL-7Rα-positiven Monozyten ohne und mit Zugabe von IL-7. Jeder Punkt repräsentiert ein Experiment. Verbundene Linien stellen abhängige Proben dar. Rechts: Differenz des Anteils an*

IL-7Rα-positiven Zellen. Jeder Balken repräsentiert ein Experiment. Gestrichelte Linie: Median der Differenzen.

Die Differenzen der FoP-Werte nach IL-7-Inkubation sind in Tabelle 12 für die jeweils höhere Konzentration der drei Stimuli zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Zugabe von IL-7 dargestellt. Angegeben ist jeweils die Differenz zwischen dem Anteil IL-7Rα-positiver Zellen mit und ohne IL-7-Inkubation.

Experiment	FoP-Differenz GM-CSF 5 ng/ml	FoP-Differenz LPS 500 pg/ml	FoP-Differenz CW 1 µg/ml
1	-5,25%	-24,40%	-46,00%
2	8,62%	-22,30%	-24,70%
3	-29,40%	-37,80%	-30,95%
4	-10,95%	-14,35%	-12,25%
5	1,42%	-15,70%	-9,60%

*Tabelle 12: **Differenz der FoP-Werte nach IL-7-Inkubation 8 Stunden nach Zugabe von IL-7.** Dargestellt ist die Differenz zwischen dem Anteil IL-7Rα-positiver Zellen mit und ohne IL-7-Inkubation. Negative Werte entsprechen einer Abnahme, positive Werte einer Zunahme des Anteils IL-7Rα-positiver Zellen nach IL-7-Inkubation.*

3.4 Hinweis zu Vorveröffentlichungen

Teile der in dieser Dissertationsschrift präsentierten Daten wurden bereits in der eingangs erwähnten Publikation veröffentlicht. Die statistischen Auswertungen, die Erstellung der Abbildungen und die Interpretation der Daten für die vorliegende Arbeit wurden eigenständig und unabhängig von der genannten Publikation durchgeführt.

Im Zuge der Erstellung dieser Dissertationsschrift erfolgte eine erneute Prüfung der zugrunde liegenden Originaldaten. Dabei wurde ein Fehler in der für die Publikation verwendeten Datenauswertung identifiziert. Die vorliegende Arbeit basiert auf den verifizierten Originaldaten und enthält die entsprechend korrigierten Ergebnisse. In einzelnen Fällen ergeben sich daraus Abweichungen gegenüber den publizierten Befunden und deren Interpretation. Die korrigierte Abbildung wird dem Journal in Kürze zur Verfügung gestellt.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der IL-7Rα-Expression auf humanen Monozyten in vitro unter kontrollierten Bedingungen. Diese erfolgte anhand dreier zentraler Fragestellungen: die stimulusabhängige Hochregulation des IL-7Rα, die Rezeptorexpression in Abhängigkeit von der zeitlichen Anwesenheit eines aktivierenden Stimulus und der Einfluss von IL-7 auf die Expression des Zielrezeptors.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass unterschiedliche Stimuli (GM-CSF, LPS und CW) zu einer Hochregulation des IL-7Rα auf Monozyten führen können. Dabei konnten stimulusabhängige Effekte beobachtet werden. Nach Stimulation mit LPS wurde der höchste Anteil an IL-7Rα-positiven Monozyten festgestellt. Bei Verwendung von GM-CSF zeigte sich eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten hinsichtlich der Expressionsstärke.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die erhöhte IL-7Rα-Expression abhängig von der dauerhaften Anwesenheit des zugrunde liegenden Stimulus ist. Nach Entzug des Stimulus kam es insbesondere bei LPS und CW zu einer zügigen und ausgeprägten Reduktion der oberflächlichen Expression von CD127. Dies spricht für dynamische Regulationsmechanismen des IL-7Rα.

Im Rahmen einer Restimulation nach Entfernung des Stimulus konnte beobachtet werden, dass mykobakterielle Zellwandbestandteile auch eine erneute Hochregulation des IL-7Rα auslösen können. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Monozyten unter den untersuchten Bedingungen nach einer transienten Reduktion der IL-7Rα-Expression auch erneut einen CD127-positiven Phänotyp ausbilden können.

Schließlich sollte untersucht werden, welchen Einfluss IL-7 auf die IL-7Rα-Expression auf Monozyten hat. Für LPS und CW zeigte sich nach stimulusabhängiger Hochregulation eine Reduktion des Anteils IL-7Rα-positiver Zellen durch die zusätzliche Inkubation mit IL-7. Dies könnte ein Hinweis auf regulatorische Mechanismen sein, durch die IL-7 die Rezeptorverfügbarkeit auf Monozyten moduliert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine stimulusabhängige Induktion der Oberflächenexpression des IL-7R auf Monozyten. Diese ist von unterschiedlichen Faktoren, wie der Anwesenheit des aktivierenden Stimulus oder der Exposition gegenüber IL-7 abhängig. Diese Ergebnisse erweitern das Verständnis der IL-7/IL-7Rα-Achse auf Monozyten und können als Grundlage für zukünftige Untersuchungen im Kontext entzündlicher oder infektiöser Erkrankungen dienen.

4.2 Stimulusabhängige Hochregulation der IL-7R-Expression

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass humane Monozyten nach einer Stimulation unter inflammatorischen Bedingungen eine vermehrte Expression des IL-7Rα aufweisen. Bereits nach 16-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Stimuli kam es im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen zu einer Zunahme des Anteils IL-7Rα-positiver Zellen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Stimuli. Die stärkste Expression wurde nach Stimulation mit LPS beobachtet, während die Effekte von GM-CSF zwischen den einzelnen Experimenten stärker variierten. Für alle drei Stimuli konnte zudem ein konzentrationsabhängiger Effekt gezeigt werden. Die Stimulation mit der jeweils höheren Konzentration führte bei allen Stimuli zu einem höheren Anteil IL-7Rα-positiver Zellen. Die Beobachtung der initial geringen Expression des IL-7Rα auf Monozyten ist mehrfach beschrieben worden (Adankwah, Harelimana et al. 2021, Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021).

Die beobachtete Hochregulation des IL-7Rα steht im Einklang mit bereits publizierten Daten, die eine IL-7Rα-Expression auf myeloischen Zellen unter inflammatorischen Bedingungen beschreiben (Zhang, Zhang et al. 2022). Auch in der Publikation, in der Teile dieser Arbeit veröffentlicht wurden, konnte gezeigt werden, dass weitere inflammatorische Stimuli, darunter TNF-α und IL-1β zu einer erhöhten Expression von IL-7Rα auf Monozyten gesunder Probanden führen. Als möglicher Regulator wurde dabei der Transkriptionsfaktor FoxO1 beschrieben (Harelimana, Ahor et al. 2022). Interessanterweise wurde bei Patienten mit aktiver Tuberkulose trotz des bestehenden inflammatorischen Milieus eine verminderte oberflächliche Expression von IL-7Rα insbesondere auf M1/2-Monozyten beschrieben (Adankwah, Harelimana et al. 2021). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation des IL-7Rα nicht ausschließlich von der Anwesenheit inflammatorischer Stimuli abhängt, sondern zusätzlich durch krankheitsspezifische Faktoren beeinflusst werden könnte.

Auffällig war insbesondere die starke Hochregulation nach Stimulation mit LPS. Bereits nach 16 Stunden zeigte sich hier der höchste Anteil CD127-positiver Monozyten aller untersuchten Bedingungen. Da LPS zu den stärksten Aktivatoren von Monozyten zählt und seine Wirkung maßgeblich über der TLR4 vermittelt wird (Guha and Mackman 2001, Luo, Yao et al. 2025), erscheint ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der inflammatorischen Aktivierung und der Expression des IL-7Rα plausibel. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei GM-CSF eine deutlich größere Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten. Ob diese Unterschiede auf interindividuelle Eigenschaften der Spender oder auf Unterschiede in der Stärke der Aktivierung zurückzuführen sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilt werden. Insgesamt konnte gezeigt

werden, dass verschiedene Stimuli zu einer Hochregulation des IL-7Rα auf Monozyten führen können. Die Stärke dieses Effektes ist abhängig vom jeweiligen Stimulus sowie von der verwendeten Konzentration.

4.3 IL-7Rα-Expression nach Stimulusentzug und Restimulation

Im nächsten Schritt wurde geprüft, wie sich die IL-7Rα-Expression nach Entfernung des jeweiligen Stimulus entwickelt. Hierzu wurden die stimulierenden Substanzen nach 16 Stunden aus den Kulturen entfernt und die CD127-Expression zu späteren Zeitpunkten erneut analysiert. Für LPS- und CW-stimulierte Monozyten zeigte sich dabei ein deutlicher Rückgang der oberflächlichen IL-7Rα-Expression, der bereits 8 Stunden nach dem Stimulusentzug erkennbar war. Dagegen blieb die Expression nach Stimulation mit GM-CSF weitgehend unverändert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hochregulation des IL-7Rα auf Monozyten nicht dauerhaft bestehen bleibt. Vielmehr scheint die Aufrechterhaltung der Expression zumindest teilweise von der kontinuierlichen Anwesenheit aktivierender Signale abhängig zu sein. Die Expression des Rezeptors stellt damit keinen statischen Zustand dar, sondern verändert sich in Abhängigkeit von den vorliegenden Umgebungsbedingungen. Vergleichbare Veränderungen der IL-7Rα-Expression wurden bereits für T-Zellen beschrieben und vorübergehende Veränderungen der CD127-Expression auf regulatorischen T-Zellen in Abhängigkeit unterschiedlicher Aktivierungsbedingungen beobachtet (Simonetta, Chiali et al. 2010).

Zur Kontrolle des Aktivierungszustandes der Monozyten wurde eine Analyse der Expression des Aktivierungsmarkers CD40 vorgenommen (siehe Anhang). Nach Entfernung des Stimulus kam es bei Abnahme der IL-7Rα-Expression nicht zu einer Abnahme der CD40-Expression, die weiterhin auf einem hohen Niveau verblieb. Dies spricht für einen anhaltenden Aktivierungszustand der Monozyten nach Entfernung des Stimulus und gegen einen vollständigen Verlust der Aktivierung als Ursache der verminderten IL-7Rα-Expression. Insgesamt finden sich Hinweise dafür, dass die Regulation des IL-7R nicht allein durch den Aktivierungszustand der Monozyten beeinflusst wird.

Im Anschluss wurde untersucht, ob die beobachtete Reduktion der IL-7Rα-Expression reversibel ist. Dazu wurden die gepulsten Zellen erneut mit dem ursprünglichen Stimulus stimuliert. Nach Restimulation mit CW zeigte sich in allen durchgeführten Experimenten erneut ein Anstieg des Anteils CD127-positiver Monozyten. Für GM-CSF und LPS konnten vergleichbare Veränderungen nicht beobachtet werden.

Die Ursache dieses Unterschiedes kann anhand der vorliegenden Daten nicht sicher beurteilt werden. Einerseits ist denkbar, dass die verschiedenen Stimuli unterschiedliche Effekte auf die Regulation des IL-7Rα ausüben. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der begrenzten Anzahl an Experimenten kleinere Effekte möglicherweise nicht erfasst werden konnten. Unabhängig davon zeigen die Ergebnisse, dass Monozyten nach einer vorübergehenden Reduktion der IL-7Rα-Expression erneut einen CD127-positiven Phänotyp ausbilden können.

Eine vergleichbare Reexpression des IL-7Rα wurde bereits für T-Zellen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass naive T-Zellen nach Beendigung einer IL-7-Exposition erneut IL-7Rα auf ihrer Oberfläche exprimieren (Alves, van Leeuwen et al. 2008). Auch für regulatorische T-Zellen wurden vorübergehende Veränderungen der IL-7Rα-Expression beschrieben (Simonetta, Chiali et al. 2010, Tabares, Berr et al. 2018). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auch Monozyten grundsätzlich zu einer erneuten Hochregulation des IL-7Rα in der Lage sind.

4.4 Einfluss von IL-7

Nachdem gezeigt werden konnte, dass verschiedene inflammatorische Stimuli zu einer Hochregulation des IL-7Rα auf Monozyten führen, wurde untersucht, welchen Einfluss eine anschließende Inkubation mit IL-7 auf die Expression des Rezeptors hat. Dabei zeigte sich für die mit CW und LPS stimulierten Monozyten eine Reduktion des Anteils IL-7Rα-positiver Zellen nach Zugabe von IL-7. Der Effekt war für CW sowie für die höhere LPS-Konzentration in allen durchgeführten Experimenten zu beobachten. Für GM-CSF konnte dagegen keine vergleichbare Veränderung nachgewiesen werden und über die durchgeführten Versuche bestanden starke Schwankungen.

Eine durch IL-7 vermittelte Abnahme der IL-7Rα-Expression auf Monozyten wurde bereits beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Monozyten nach 24-stündiger Inkubation von PBMCs mit IL-7 eine geringere IL-7Rα-Expression aufwiesen als unstimulierte Kontrollzellen (Hehenkamp, Hoffmann et al. 2021). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern diese Beobachtung auf zuvor aktivierte Monozyten und zeigen, dass die Wirkung von IL-7 auch nach einer stimulusabhängigen Hochregulation des Rezeptors nachweisbar bleibt.

Auffällig war, dass sich die Effekte von IL-7 zwischen den verwendeten Stimuli unterschieden. Während für CW und LPS eine Reduktion der IL-7Rα-Expression beobachtet wurde, zeigte sich für GM-CSF kein vergleichbarer Effekt. Ob dies auf Unterschiede der zugrunde liegenden Aktivierungswege zurückzuführen ist oder durch die begrenzte Anzahl an Experimenten beeinflusst wurde, kann anhand der

vorliegenden Daten nicht sicher beurteilt werden. Die Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass die Wirkung von IL-7 auf Monozyten vom jeweiligen Aktivierungsmodus der Zellen abhängig sein könnte.

Vergleichbare Regulationsmechanismen wurden bereits für T-Zellen beschrieben. Dort führt die Exposition gegenüber IL-7 zu einer Reduktion der Verfügbarkeit des IL-7Rα auf der Zelloberfläche und wird als Bestandteil eines negativen Rückkopplungsmechanismus angesehen (Henriques, Rino et al. 2010). Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Funktion und der deutlich geringeren basalen Expression des IL-7Rα auf Monozyten ist eine direkte Übertragung dieser Mechanismen jedoch nur eingeschränkt möglich. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen dennoch, dass IL-7 auch auf Monozyten nicht ausschließlich als stimulierender Faktor wirkt, sondern die Expression seines eigenen Rezeptors beeinflussen kann. Welche funktionellen Konsequenzen die beobachteten Veränderungen der IL-7Rα-Expression für Monozyten besitzen, kann anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht abschließend beurteilt werden. Da IL-7 in verschiedenen Studien mit Veränderungen der Zytokinproduktion, Migration und antimikrobiellen Aktivität von Monozyten in Verbindung gebracht wurde, erscheint die Untersuchung solcher Funktionen in zukünftigen Arbeiten sinnvoll.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass IL-7 die Expression des IL-7Rα auf aktivierten Monozyten reguliert. Die beobachteten Effekte waren dabei vom verwendeten Stimulus abhängig. Dies weist auf eine komplexe Regulation der IL-7/IL-7Rα-Achse auf Monozyten hin und unterstreicht, dass die biologische Wirkung von IL-7 auf Zellen des angeborenen Immunsystems vom jeweiligen inflammatorischen Kontext beeinflusst wird.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation aktivierter Monozyten mit IL-7 zu einer Reduktion der oberflächlichen IL-7Rα-Expression führen kann. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Zukünftige Experimente könnten daher klären, ob die beobachtete Reduktion auf Veränderungen der Rezeptorverfügbarkeit an der Zelloberfläche oder auf eine verminderte Neusynthese des Rezeptors zurückzuführen ist. Für T-Zellen wurden sowohl eine Clathrin-vermittelte Internalisierung des IL-7Rα (Faller, Ghazawi et al. 2016) als auch transkriptionsabhängige Mechanismen der Regulation beschrieben (Ghazawi, Faller et al. 2013). Ob vergleichbare Prozesse auch in Monozyten zur Regulation der IL-7Rα-Expression beitragen, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die beobachteten Veränderungen der IL-7Rα-Expression auch mit Veränderungen der Effektorfunktionen von Monozyten einhergehen. Insbesondere mögliche Effekte auf die Zytokinproduktion,

Phagozytoseleistung oder Antigenpräsentation könnten zur weiteren Charakterisierung der biologischen Bedeutung der IL-7/IL-7Rα-Achse beitragen.

4.5 Limitationen

In der vorliegenden Arbeit wird die Regulation der IL-7Rα-Expression auf humanen Monozyten unter *in-vitro*-Bedingungen charakterisiert. Trotz der beschriebenen Effekte sollten bei der Interpretation der Ergebnisse verschiedene Limitationen berücksichtigt werden.

Zunächst sei als Limitation dieser Arbeit die geringe Anzahl biologischer Spender genannt. Obwohl die Experimente unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurden und für mehrere Fragestellungen Unterschiede gezeigt werden konnten, könnte die begrenzte Stichprobengröße dazu geführt haben, dass kleinere biologische Effekte nicht vollständig erfasst wurden. Insbesondere die Versuche mit GM-CSF sowie einzelne Bedingungen der Experimente mit IL-7-Inkubation beziehungsweise nach Restimulation sind hier zu nennen. Außerdem schränkte die geringe Fallzahl mit n=5 die statistische Auswertung ein. Es konnten nur wenige statistische Tests mit ausreichender Aussagekraft durchgeführt werden, sodass die Interpretation der Ergebnisse in einzelnen Versuchsbedingungen primär auf deskriptiven Beobachtungen und Trends zwischen den Experimenten beruht. Zukünftige Untersuchungen sollten daher eine größere Anzahl biologischer Replikate einschließen, um die beobachteten Effekte mit höherer statistischer Sicherheit beurteilen zu können.

Des Weiteren wurden die Versuche an isolierten Monozyten unter *in-vitro*-Bedingungen durchgeführt. Auf der einen Seite ermöglicht dieses Versuchsmodell eine gezielte Untersuchung einzelner Einflussfaktoren und reduziert gleichzeitig potenzielle Störeinflüsse durch andere Zellpopulationen. Auf der anderen Seite bildet es die komplexen Bedingungen von inflammatorischen Milieus nur eingeschränkt ab. Potenzielle Wechselwirkungen mit anderen Immunzellen, Zytokinen oder anderem Gewebe konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden.

Die Analyse der IL-7Rα-Expression erfolgte ausschließlich mittels Durchflusszytometrie. Dadurch konnten Veränderungen der oberflächlichen Rezeptorexpression zuverlässig erfasst werden. Aussagen über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht möglich. Insbesondere kann nicht unterschieden werden, ob die beobachteten Veränderungen auf einer veränderten Transkription des IL7RA-Gens, einer veränderten Rezeptorstabilität oder einer veränderten Verfügbarkeit des Rezeptors an der Zelloberfläche beruhen.

Weiterhin wurden keine funktionellen Untersuchungen der aktivierten Monozyten durchgeführt. Die Arbeit erlaubt daher Aussagen über die Regulation der IL-7Rα-Expression, nicht jedoch über die funktionellen Konsequenzen dieser beobachteten Veränderungen. Ob die veränderte Expression von CD127 mit Veränderungen der Zytokinproduktion, der Differenzierung oder weiterer monozytärer Funktionen einhergeht, muss in zukünftigen Arbeiten erforscht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen daher vor dem Hintergrund dieser beschriebenen Limitationen interpretiert werden. Gleichzeitig liefern die erhobenen Daten wichtige Hinweise auf die Regulation der IL-7/IL-7Rα-Achse auf Monozyten und bilden eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Mechanismen und deren funktioneller Bedeutung.

4.6 Fazit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der IL-7Rα-Expression auf humanen Monozyten unter kontrollierten *in-vitro*-Bedingungen. Dabei konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche inflammatorische Stimuli, darunter GM-CSF, LPS und mykobakterielle Zellwandbestandteile, eine Hochregulation des IL-7Rα auf Monozyten induzieren können. Die Stärke der Expression war dabei vom verwendeten Stimulus und dessen Konzentration abhängig.

Im Übrigen konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression des IL-7Rα nicht dauerhaft bestehen bleibt. Nach Entfernung des stimulierenden Signals kam es insbesondere für mit LPS und CW stimulierte Monozyten zu einer Reduktion der oberflächlichen Expression von CD127. Nach erneuter Stimulation mit mykobakteriellen Zellwandbestandteilen konnte wiederum eine Reexpression des Rezeptors beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine dynamische Regulation des IL-7Rα auf Monozyten.

Schließlich zeigte die Inkubation mit IL-7, dass der Ligand die Expression seines eigenen Rezeptors beeinflussen kann. Für mit LPS und CW stimulierte Monozyten führte die Exposition gegenüber IL-7 zu einer Reduktion des Anteils IL-7Rα-positiver Zellen. Die Wirkung von IL-7 auf Monozyten scheint somit vom jeweiligen inflammatorischen Kontext abhängig zu sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Expression des IL-7Rα auf Monozyten durch inflammatorische Stimuli, deren zeitliche Anwesenheit sowie durch IL-7 selbst reguliert wird. Die gewonnenen Daten erweitern das Verständnis der IL-7/IL-7Rα-Achse auf Zellen des angeborenen Immunsystems und liefern eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen zu deren biologischer und klinischer Bedeutung.

5. Literaturverzeichnis

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.

Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.

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.

Alderson, M. R., R. J. Armitage, T. W. Tough, L. Strockbine, W. C. Fanslow and M. K. Spriggs (1993). "CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40." J Exp Med **178**(2): 669-674.

Alderson, M. R., T. W. Tough, S. F. Ziegler and K. H. Grabstein (1991). "Interleukin 7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes." J Exp Med **173**(4): 923-930.

Alves, N. L., E. M. van Leeuwen, I. A. Derks and R. A. van Lier (2008). "Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling." J Immunol **180**(8): 5201-5210.

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.

Barros, P. O., T. K. Berthoud, N. Aloufi and J. B. Angel (2021). "Soluble IL-7Rα/sCD127 in Health, Disease, and Its Potential Role as a Therapeutic Agent." Immunotargets Ther **10**: 47-62.

Bednarz-Misa, I., M. A. Bromke and M. Krzystek-Korpacka (2021). "Interleukin (IL)-7 Signaling in the Tumor Microenvironment." Adv Exp Med Biol **1290**: 9-49.

Bloom, B. R., R. Atun, T. Cohen, C. Dye, H. Fraser, G. B. Gomez, G. Knight, M. Murray, E. Nardell, E. Rubin, J. Salomon, A. Vassall, G. Volchenkov, R. White, D. Wilson and P. Yadav (2017). Tuberculosis. Major Infectious Diseases. K. K. Holmes, S. Bertozzi, B. R. Bloom and P. Jha. Washington (DC), The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank

© 2017 International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.

Candéias, S., K. Muegge and S. K. Durum (1997). "IL-7 receptor and VDJ recombination: trophic versus mechanistic actions." Immunity **6**(5): 501-508.

Chen, D., T. X. Tang, H. Deng, X. P. Yang and Z. H. Tang (2021). "Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis." Front Immunol **12**: 747324.

Chen, Z., S. J. Kim, N. D. Chamberlain, S. R. Pickens, M. V. Volin, S. Volkov, S. Arami, J. W. Christman, B. S. Prabhakar, W. Swedler, A. Mehta, N. Sweiss and S. Shahrara (2013). "The novel role of IL-7 ligation to IL-7 receptor in myeloid cells of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis." J Immunol **190**(10): 5256-5266.

Costello, R., J. Imbert and D. Olive (1993). "Interleukin-7, a major T-lymphocyte cytokine." Eur Cytokine Netw **4**(4): 253-262.

Dash, S. P., S. Gupta and P. P. Sarangi (2024). "Monocytes and macrophages: Origin, homing, differentiation, and functionality during inflammation." Heliyon **10**(8): e29686.

Digel, W., M. Schmid, G. Heil, P. Conrad, S. Gillis and F. Porzsolt (1991). "Human interleukin-7 induces proliferation of neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemia and acute leukemias." Blood **78**(3): 753-759.

ElKassar, N. and R. E. Gress (2010). "An overview of IL-7 biology and its use in immunotherapy." J Immunotoxicol **7**(1): 1-7.

Faller, E. M., F. M. Ghazawi, M. Cavar and P. A. MacPherson (2016). "IL-7 induces clathrin-mediated endocytosis of CD127 and subsequent degradation by the proteasome in primary human CD8 T cells." Immunol Cell Biol **94**(2): 196-207.

Ghazawi, F. M., E. M. Faller, S. M. Sugden, J. A. Kakal and P. A. MacPherson (2013). "IL-7 downregulates IL-7Rα expression in human CD8 T cells by two independent mechanisms." Immunol Cell Biol **91**(2): 149-158.

Ghoreschi, K., A. Laurence and J. J. O'Shea (2009). "Janus kinases in immune cell signaling." Immunol Rev **228**(1): 273-287.

Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." Cell Signal **13**(2): 85-94.

Harelimana, J. D., H. S. Ahor, B. Benner, S. Hellmuth, E. Adankwah, D. Minadzi, W. Aniagyei, M. N. K. Lamptey, J. Arthur, A. Yeboah, M. K. Abass, L. B. Debrah, D. O. Owusu, E. Mayatepek, J. Seyfarth, R. O. Phillips and M. Jacobsen (2022). "Cytokine-induced transient monocyte IL-7Ra expression and the serum milieu in tuberculosis." Eur J Immunol.

Hehenkamp, P., M. Hoffmann, S. Kummer, C. Reinauer, C. Döing, K. Förtsch, 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 **51**(12): 3214-3227.

Henriques, C. M., J. Rino, R. J. Nibbs, G. J. Graham and J. T. Barata (2010). "IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells." Blood **115**(16): 3269-3277.

Hofmeister, R., A. R. Khaled, N. Benbernou, E. Rajnavolgyi, K. Muegge and S. K. Durum (1999). "Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 41-60.

Horev, L., S. Unger, V. Molho-Pessach, T. Meir, A. Maly, P. Stepensky, M. Zamir, B. Keller, S. Babay, K. Warnatz, Y. Ramot and A. Zlotogorski (2015). "Generalized verrucosis and HPV-3 susceptibility associated with CD4 T-cell lymphopenia caused by inherited human interleukin-7 deficiency." J Am Acad Dermatol **72**(6): 1082-1084.

Jentho, E. and S. Weis (2021). "DAMPs and Innate Immune Training." Front Immunol **12**: 699563.

Jones, R. G., M. Parsons, M. Bonnard, V. S. Chan, W. C. Yeh, J. R. Woodgett and P. S. Ohashi (2000). "Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo." J Exp Med **191**(10): 1721-1734.

Kim, S. J., H. J. Chang, M. V. Volin, S. Umar, K. Van Raemdonck, A. Chevalier, K. Palasiewicz, J. W. Christman, S. Volkov, S. Arami, M. Maz, A. Mehta, R. K. Zomorrodi, D. A. Fox, N. Sweiss and S. Shahrara (2020). "Macrophages are the primary effector cells in IL-7-induced arthritis." Cell Mol Immunol **17**(7): 728-740.

Lara, S., S. Akula, Z. Fu, A. K. Olsson, S. Kleinau and L. Hellman (2022). "The Human Monocyte-A Circulating Sensor of Infection and a Potent and Rapid Inducer of Inflammation." Int J Mol Sci **23**(7).

Lee, J., H. Tam, L. Adler, A. Ilstad-Minnihan, C. Macaubas and E. D. Mellins (2017). "The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines." PLoS One **12**(8): e0183594.

Li, R., A. Paul, K. W. Ko, M. Sheldon, B. E. Rich, T. Terashima, C. Dieker, S. Cormier, L. Li, E. A. Nour, L. Chan and K. Oka (2012). "Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium." Eur Heart J **33**(24): 3114-3123.

Li, S., Z. Wang, G. Zhang, J. Fu and X. Zhang (2019). "Interleukin-7 promotes lung-resident CD14(+) monocytes activity in patients with lung squamous carcinoma." Int Immunopharmacol **67**: 202-210.

Lin, J. X. and W. J. Leonard (2018). "The Common Cytokine Receptor γ Chain Family of Cytokines." Cold Spring Harb Perspect Biol **10**(9).

Liu, Z. H., M. H. Wang, H. J. Ren, W. Qu, L. M. Sun, Q. F. Zhang, X. S. Qiu and E. H. Wang (2014). "Interleukin 7 signaling prevents apoptosis by regulating bcl-2 and bax via the p53 pathway in human non-small cell lung cancer cells." Int J Clin Exp Pathol **7**(3): 870-881.

Luo, R., Y. Yao, Z. Chen and X. Sun (2025). "An examination of the LPS-TLR4 immune response through the analysis of molecular structures and protein-protein interactions." Cell Commun Signal **23**(1): 142.

Lyon, S. M. and M. D. Rossman (2017). "Pulmonary Tuberculosis." Microbiol Spectr **5**(1).

Mach, F., U. Schönbeck, J. Y. Bonnefoy, J. S. Pober and P. Libby (1997). "Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor." Circulation **96**(2): 396-399.

Mackall, C. L., T. J. Fry and R. E. Gress (2011). "Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application." Nat Rev Immunol **11**(5): 330-342.

Martinet, Y., N. Martinet, J. M. Vignaud and F. Plenat (1994). "Blood monocyte chemotaxis." J Immunol Methods **174**(1-2): 209-214.

Meyer, A., P. J. Parmar and S. Shahrara (2022). "Significance of IL-7 and IL-7R in RA and autoimmunity." Autoimmun Rev **21**(7): 103120.

Ming, J., G. Jiang, Q. Zhang, X. Qiu and E. Wang (2012). "Interleukin-7 up-regulates cyclin D1 via activator protein-1 to promote proliferation of cell in lung cancer." Cancer Immunol Immunother **61**(1): 79-88.

Muntjewerff, E. M., L. D. Meesters and G. van den Bogaart (2020). "Antigen Cross-Presentation by Macrophages." Front Immunol **11**: 1276.

Namen, A. E., S. Lupton, K. Hjerrild, J. Wignall, D. Y. Mochizuki, A. Schmierer, B. Mosley, C. J. March, D. Urdal and S. Gillis (1988). "Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7." Nature **333**(6173): 571-573.

Peschon, J. J., P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, J. D. Meyer and B. L. Davison (1994). "Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice." J Exp Med **180**(5): 1955-1960.

Puel, A. and W. J. Leonard (2000). "Mutations in the gene for the IL-7 receptor result in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency disease." Curr Opin Immunol **12**(4): 468-473.

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.

Rane, L., S. Rahman, I. Magalhaes, A. Ambati, J. Andersson, A. Zumla, S. Brighenti and M. J. Maeurer (2017). "IL-7δ5 protein is expressed in human tissues and induces expression of the oxidized low density lipoprotein receptor 1 (OLR1) in CD14+ monocytes." Int J Infect Dis **59**: 29-36.

Simonetta, F., A. Chiali, C. Cordier, A. Urrutia, I. Girault, S. Bloquet, C. Tanchot and C. Bourgeois (2010). "Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells." Eur J Immunol **40**(9): 2528-2538.

Sinistro, A., C. Almerighi, C. Ciaprini, S. Natoli, E. Sussarello, S. Di Fino, F. Calò-Carducci, G. Rocchi and A. Bergamini (2008). "Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients." Clin Vaccine Immunol **15**(12): 1851-1858.

Stutz, M. D., M. P. Clark, M. Doerflinger and M. Pellegrini (2018). "Mycobacterium tuberculosis: Rewiring host cell signaling to promote infection." J Leukoc Biol **103**(2): 259-268.

Sutherland, G. R., E. Baker, K. E. Fernandez, D. F. Callen, R. G. Goodwin, S. Lupton, A. E. Namen, M. F. Shannon and M. A. Vadas (1989). "The gene for human interleukin 7 (IL7) is at 8q12-13." Hum Genet **82**(4): 371-372.

Tabares, P., S. Berr, D. Langenhorst, B. Sawitzki, I. Ten Berge, H. P. Tony and T. Hünig (2018). "Short-term cytokine stimulation reveals regulatory T cells with down-regulated Foxp3 expression in human peripheral blood." Eur J Immunol **48**(2): 366-379.

Tantawichien, T., L. S. Young and L. E. Bermudez (1996). "Interleukin-7 induces anti-Mycobacterium avium activity in human monocyte-derived macrophages." J Infect Dis **174**(3): 574-582.

Teutsch, S. M., D. R. Booth, B. H. Bennetts, R. N. Heard and G. J. Stewart (2003). "Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor-alpha gene and their associations with multiple sclerosis." Eur J Hum Genet **11**(7): 509-515.

von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach and R. Murray (1995). "Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine." J Exp Med **181**(4): 1519-1526.

Vuong, J. T., A. F. Stein-Merlob, A. Nayeri, T. Sallam, T. G. Neilan and E. H. Yang (2022). "Immune Checkpoint Therapies and Atherosclerosis: Mechanisms and Clinical Implications: JACC State-of-the-Art Review." J Am Coll Cardiol **79**(6): 577-593.

Wang, C., L. Kong, S. Kim, S. Lee, S. Oh, S. Jo, I. Jang and T. D. Kim (2022). "The Role of IL-7 and IL-7R in Cancer Pathophysiology and Immunotherapy." Int J Mol Sci **23**(18).

Ward, A. C. (2026). "The Interleukin-7 Receptor Signaling Pathway and Its Perturbation in Immunodeficiency, Autoimmune Disease and Lymphoid Malignancy." Biomolecules **16**(2).

Wei, C., R. Zeff and I. Goldschneider (2000). "Murine pro-B cells require IL-7 and its receptor complex to up-regulate IL-7R alpha, terminal deoxynucleotidyltransferase, and c mu expression." J Immunol **164**(4): 1961-1970.

Yamamoto, M. and K. Takeda (2010). "Current views of toll-like receptor signaling pathways." Gastroenterol Res Pract **2010**: 240365.

Zhang, B., Y. Zhang, L. Xiong, Y. Li, Y. Zhang, J. Zhao, H. Jiang, C. Li, Y. Liu, X. Liu, H. Liu, Y. F. Ping, Q. C. Zhang, Z. Zhang, X. W. Bian, Y. Zhao and X. Hu (2022). "CD127 imprints functional heterogeneity to diversify monocyte responses in inflammatory diseases." J Exp Med **219**(2).

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.

6. Anhang

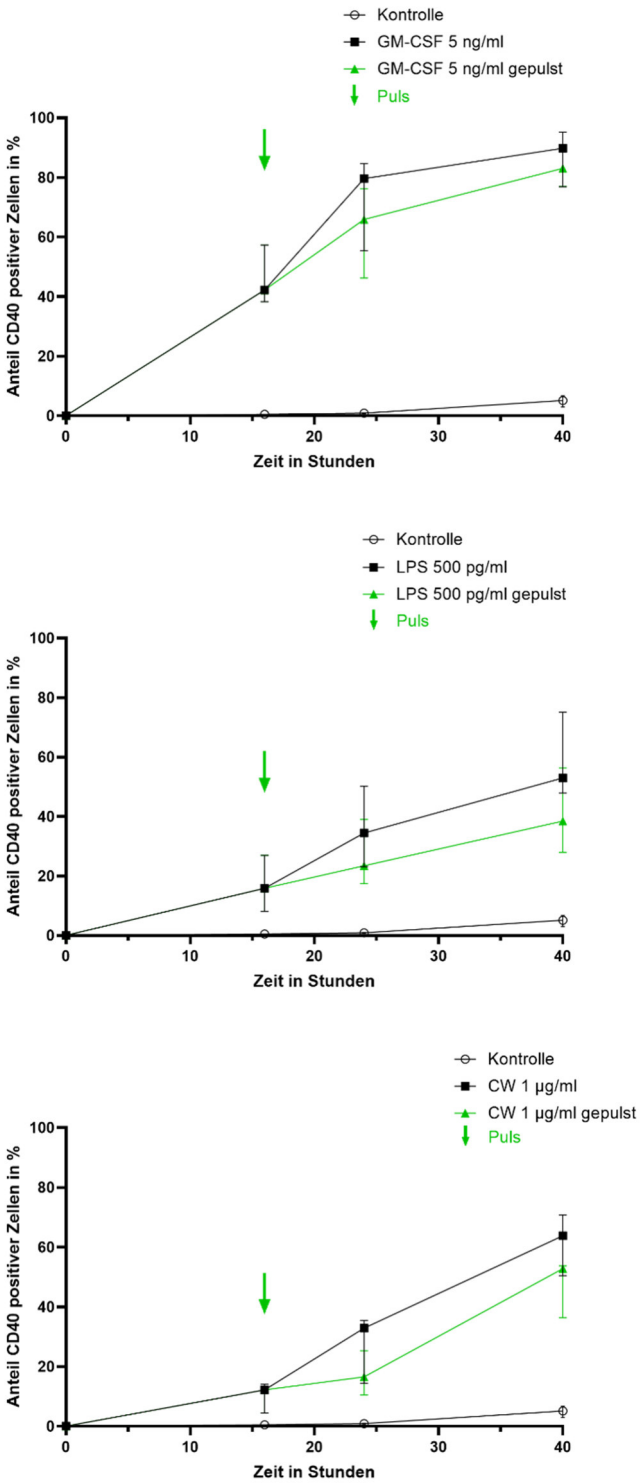


Abbildung 13: ***Zeitverlauf der CD40-positiven Zellen.*** *Stimulusentzug nach 16 Stunden. Von oben nach unten: GM-CSF 5 ng/ml, LPS 500 pg/ml, CW 1 µg/ml. n=5, Darstellung der Mediane sowie der 25. und der 75. Perzentile. Diese Abbildung basiert auf bereits publizierten Daten (Harelimana, Ahor et al. 2022), die im Rahmen dieser Dissertation neu ausgewertet und dargestellt wurden.*

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Marc Jacobsen für die Vergabe des spannenden Themas bedanken, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und für seine Supervision bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenso herzlich danke ich Frau Prof. Dr. Verena Keitel für die Übernahme der Zweitbetreuung, für ihre langjährige Unterstützung und ihren Rat im Rahmen dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Julia Seyfarth dafür, dass sie jederzeit erreichbar war, für ihren Pragmatismus bei Problemen und Schwierigkeiten und ihre Fähigkeit auch bei komplizierten Fragen stets den Überblick zu bewahren.

Jean danke ich für seine große Hilfsbereitschaft im Labor, seine unermüdliche und geduldige Art und seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung. Paul danke ich insbesondere für die Einarbeitung in die weite Welt der Zellisolation und Durchflusszytometrie.

Besonders möchte ich Josefine erwähnen, die während der gesamten Zeit meine engste Laborpartnerin war. Vielen Dank für die vielen gemeinsamen Gespräche, die gegenseitige Unterstützung und die gemeinsame Bewältigung kleinerer und größerer Herausforderungen.

Bei Rozie, Sabine, Ju-Young, Max und Ernest sowie dem gesamten Team des Stoffwechsellabors möchte ich mich für die spannende, lehrreiche und zugleich stets angenehme Zeit bedanken. Ob ein nettes Wort auf dem Flur, ein gemeinsames Frühstück zu Karneval oder ein Kaffee in der Laborküche, die Zusammenarbeit mit euch hat meine Zeit im Labor auf eine sehr positive Weise geprägt.

Lina, Erik und Stefan danke ich herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit, für die freundschaftliche Unterstützung sowie für die zahlreichen motivierenden Gespräche, die weit über die Dissertation hinaus geholfen haben.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Antje und Klaus sowie meinem Bruder Gereon mit Emma und Samuel danke ich von ganzem Herzen für ihre immerwährende Unterstützung in jeder Lebenslage! Ohne Euren Support wäre so vieles in meinem Leben nicht möglich gewesen. Danke auch an alle meine Freunde, die sich die ein oder andere Geschichte dieser Reise mit viel Geduld anhören durften und mussten.

Mein größter Dank gilt Janina. Ihre unendliche Unterstützung, ihr Zuspruch, ihre Geduld und ihr Vertrauen haben mich weitergebracht, als ich alleine jemals gekommen wäre.