

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer**



**Zytokinstimulation von mononukleären Zellen des
peripheren Blutes (PBMC) von Patienten mit Diabetes
Mellitus Typ 1**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Benjamin Georg Heinz Zimmermann

aus Oldenburg

Würzburg, Januar 2018

Referent: Prof. Dr. med. Martina Prelog
Korreferent: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2020

Der Promovend ist Arzt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Promotionsarbeit „Zytokinstimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 1“ eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die verwendeten Inhalte als solche kenntlich gemacht. Ich erkläre außerdem, dass diese Promotionsarbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt worden ist.

Oldenburg, den

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundzüge des Immunsystems	1
1.1.1	Angeborene und adaptive Immunabwehr	1
1.2	Immunologie der T-Lymphozyten	2
1.2.1	Grundlagen der T-Zell Immunologie und T-Zell Entwicklung	2
1.2.2	Zentrale und Periphere T-Zell Toleranz	3
1.2.3	T-Zell Differenzierung und Klassifizierung CD4 positiver Zellen	4
1.2.4	Funktion der CD 4 positiven T-Lymphozyten bei Primärer und Sekundärer Immunantwort	7
1.2.5	T-Zell Homöostase: Proinflammatorische T-Lymphozyten und deren Regulation	8
1.2.5.1	TH1/TH2 Paradigma	8
1.2.5.2	TH17-Zellen	9
1.2.5.3	Regulatorische T-Lymphozyten	12
1.3	Diabetes mellitus Typ 1	14
1.3.1	Grundlagen des Diabetes mellitus Typ 1	14
1.3.2	Rolle der TH17-Treg Homöostase beim Typ 1 Diabetes Mellitus	16
1.4	Candida albicans als opportunistischer Erreger	18
1.4.1	Grundlagen C. albicans	18
1.4.2	Infektion mit C. albicans im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 1	19
1.5	Ziele der Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.2	Probanden	27
2.3	Präparation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut .	29
2.3.1	Isolierung aus Vollblut mittels Ficoll Paque	29

2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	30
2.3.3	Kryokonservierung von T-Lymphozyten	31
2.4	T-Zell Isolation aus PBMC	32
2.4.1	Magnetische Zellseparation (MACS)	32
2.4.2	Isolation CD4 positiver T-Lymphozyten aus PBMCs	34
2.4.3	Isolation naiver (CD45RA+CD27-) T-Lymphozyten aus der Gesamtheit CD4 positiver T-Lymphozyten	34
2.4.4	Isolierung von CD25+ T-Lymphozyten mit MACS-Beads	35
2.5	Allgemeine Kulturbedingungen	36
2.6	Zellkultur von naiven T-Lymphozyten	36
2.6.1	Versuchsansatz und Kulturbedingungen	36
2.6.2	Generierung von Feederzellen	38
2.7	Untersuchung der Suppressionsfähigkeit von CD25 positiven Tregs	39
2.7.1	Versuchsansatz und Kulturbedingungen	39
2.7.2	Generierung von CD25+ Tregs in der Zellkultur	39
2.7.3	CFSE Färbung von vitalen T-Lymphozyten	40
2.7.4	Co-Kultivierung von CD25+ Tregs und CFSE markierten Effektor-T-Lymphozyten	40
2.8	Durchflusszytometrie - FACS	41
2.8.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	41
2.8.2	Färbung von Zelloberflächenmolekülen	43
2.8.3	Färbung von intrazellulären Zellmarkern	44
2.8.4	CFSE Detektion zur Proliferationsdiagnostik	45
2.9	Statistische Analyse	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Zellkultur	47
3.1.1	Reinheit der CD4+ und CD4+CD45RA+CD27- T-Zellfraktionen nach MACS-Isolation	47
3.1.1.1	Ergebnisse zu untersuchten Proben von Kindern	47
3.1.1.2	Ergebnisse zu untersuchten Proben von Erwachsenen	48
3.1.2	Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Dia- betes mit den Kontrollpatienten	49

3.1.3	Untersuchung der Polarisierbarkeit unter spezifischer Stimulation	50
3.1.3.1	Stimulusabhängige Unterschiede des T-Zell-Verhaltens bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes und den Kontrollpatienten	50
3.1.3.2	Beeinflussung des T-Zell Verhaltens bei spezifischer Stimulation	55
3.1.4	Untersuchung des T-Zell Verhaltens innerhalb weiterer Gruppen an Diabetes erkrankter Probanden bei unspezifischer Stimulation	56
3.1.4.1	Vergleich der Kinder mit einem länger bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten	56
3.1.4.2	Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den gesunden Kontrollpatienten	58
3.1.5	Untersuchung des T-Zell Verhaltens innerhalb weiterer Gruppen an Diabetes erkrankter Probanden bei spezifischer Stimulation	60
3.1.5.1	Stimulusabhängige Unterschiede des T-Zell-Verhaltens bei den Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes	60
3.1.5.2	Vergleich der Kinder mit einem länger bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten	62
3.1.5.3	Stimulusabhängige Unterschiede des T-Zell-Verhaltens in den Versuchsgruppen der Erwachsenen	65
3.1.5.4	Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten	66
3.1.6	Untersuchung des Verhaltens der T-Zell Regulation bei unspezifischer Stimulation in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu	69
3.1.6.1	Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mit den Kontrollpatienten unter antiinflammatorischen Bedingungen	69
3.1.6.2	Vergleich der Kinder mit einem länger bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten unter antiinflammatorischen Bedingungen	70

3.1.6.3	Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten unter antiinflammatorischen Bedingungen	71
3.1.7	Untersuchung des Verhaltens der T-Zell Regulation bei spezifischer Stimulation in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu	72
3.1.7.1	Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus und den Kontrollpatienten	72
3.1.7.2	Vergleich der Kinder mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten	73
3.1.7.3	Stimulusabhängige Unterschiede des Verhaltens der T-Zell-Regulation in den Versuchsgruppen der Kinder in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu	73
3.1.7.4	Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten	75
3.1.7.5	Stimulusabhängige Unterschiede des Verhaltens der T-Zell-Regulation in den Versuchsgruppen der Erwachsenen in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu	77
3.2	Suppressionsversuche	78
3.2.1	Auswertung der Reinheit CD4+ T-Lymphozyten nach MACS Isolation vor Treg Induktion	78
3.2.2	Auswertung der Reinheit der CD25+ T-Lymphozyten nach Induktion und MACS Isolation vor Suppression	79
3.2.3	Suppressionsfähigkeit induzierter Tregs	79
3.3	Beeinflussung des T-Zell-Verhaltens durch Einfluss von TGF β und Blockade von IFN γ	82
3.3.1	Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus	82
3.3.2	Kinder mit einem länger bestehendem Diabetes Diabetes mellitus	85
3.3.3	Erwachsene Diabetiker	87

4	Diskussion	90
4.1	Stimulationsversuche	90
4.1.1	Wie stellt sich die Verteilung der naiven, Memory-, Effektor- und terminalen T-Lymphozyten nach Stimulation dar und welche Unterschiede finden sich zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?	90
4.1.2	Zeigen sich Unterschiede in der proinflammatorischen Antwort (charakterisiert durch die Produktion von IL17 und IFN γ) zwischen den Gruppen in Folge der Stimulation? . .	91
4.1.3	Gibt es Unterschiede in der Proliferationsaktivität (charakterisiert durch die Expression von Ki67) der proinflammatorischen, IL17 und IFN γ produzierenden T-Zellen in Folge der Stimulation zwischen den Patienten mit Diabetes und den Kontrollpatienten?	95
4.1.4	Zeigen sich Unterschiede in der quantitativen Verteilung von regulatorischen T-Lymphozyten (CD25+FOXP3+) nach Stimulation?	97
4.1.5	Zeigen sich Unterschiede in der proliferativen Aktivität (charakterisiert durch die Expression von Ki67) der Tregs zwischen den Gruppen?	98
4.1.6	Gibt es Unterschiede in der Zytokinproduktion von IL10 und IL17 durch Tregs zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?	99
4.1.7	Zeigt sich für die Untergruppe der CD127 negativen Tregs (CD25+FOXP3+CD127-) ein differentes Verhalten bezüglich der quantitativen Verteilung oder der Ausprägung der IL10- und IL17-Produktion?	100
4.1.8	Gibt es Unterschiede in der Expression des Oberflächensmoleküls CD62L auf den Tregs zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?	104
4.1.9	Zeigen sich Unterschiede in der Expression des IFN γ -Rezeptors auf der Gesamtheit der T-Zellen nach Stimulation zwischen den Gruppen?	105
4.2	Suppressionsversuche	106

4.3	Beeinflussung des Verhaltens naiver T-Zellen durch Blockade von IFN γ oder Zugabe von TGF β	107
4.3.1	Beeinflussung des Verhaltens naiver T-Zellen durch Blockade von IFN γ	107
4.3.2	Einfluss von TGF β	109
4.4	Limitierende Einflussfaktoren	110
4.4.1	In vitro Verhältnisse	110
4.4.2	Periphere T-Lymphozyten zur Erforschung einer Erkrankung im Pankreas	111
4.4.3	MACS-Separation	112
4.5	Ausblick	112
5	Zusammenfassung	114
6	Abstract	118
	Literatur	121
	Abbildungsverzeichnis	135
	Tabellenverzeichnis	138
	Danksagung	139
	Lebenslauf	140
	Anhang	141

APC	antigenpräsentierende Zellen
aCD3/aCD28	CD3-Antigen und CD28-Antigen
BFA	Brefeldin A
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C. albicans	Candida albicans
c	Konzentration
CCL	CC-Motiv-Chemokin Ligand
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidylester
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzym linked immunosorbend assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum, dt.: Fetales Kälberserum
FOXP3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Forwardscatter
GAD	Glutamat Decarboxylase
HEV	Hochendotheliale Venolen
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked
iTreg	induzierte regulatorische T Zelle
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Kontrollpatienten
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonuclein Acid
NaCl	Natrium Chlorid
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells

NFκB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-cells
nm	nanometer
NOD	Non-Obese-Diabetic
nTreg	natürliche regulatorische T Zelle
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RORγt	Retinoic Acid Receptor Related Orphan Receptor Gamma t
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
sog.	so genannte
SSC	Sidescatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TEMRA	terminally differentiated effector memory cells
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TNFβ	Tumornekrosefaktor beta
TREC	T cell receptor excision circles
Treg	regulatorische T Zelle
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
u.a.	unter anderem
U/Min	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Grundzüge des Immunsystems

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunabwehr

Der Schutz vor Krankheitserregern und Fremdstoffen wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener zellulärer und humoraler Bestandteile des Körpers unterhalten. Die Gesamtheit dieser Bestandteile bildet ein in seiner Masse ca. 2 - 3 kg schweres Organ, das Immunsystem [109].

Eine mögliche Unterteilung des Immunsystems ist die Einteilung in einen angeborenen und einen adaptiven Teil. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage sofort, ohne vorherigen Kontakt zum Erreger zu reagieren. Hierbei greift es unspezifisch alle, bspw. durch so genannte Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptor) als fremd erkannten Strukturen im Organismus an. Ein immunologisches Gedächtnis entsteht hierbei nicht. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören die Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen und Natürliche Killerzellen. Zu den löslichen Komponenten gehören u.a. die Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem, Defensine, Lysozym und diverse Zytokine [96].

Der adaptive Teil setzt sich auf zellulärer Ebene aus den B- und T-Lymphozyten zusammen. Das adaptive, humorale Immunsystem besteht aus den durch die B-Zellen produzierten Antikörpern. Charakteristikum hierbei ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, so dass bei einer Reinfektion eine schnelle Immunantwort erfolgen kann [96].

Die immunologische Antwort bei Primärinfektion zeichnet sich durch ein Zusammenspiel beider Teile des Immunsystems aus. Zunächst findet eine Reaktion des angeborenen Immunsystems statt. Es kommt u.a. zur Bildung von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein und zur Aktivierung des Komplementsystems mit Apoptoseinduktion. Ausgeschüttete Zytokine wie z.B. Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) oder Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) vermitteln als Botenstoffe die Aktivierung, chemotaktische Rekrutierung und koordinierte Zusammenarbeit

der verschiedenen Bestandteile der Immunabwehr. Während das angeborene Immunsystem versucht, die Infektion zu kontrollieren, kommt es durch die Präsenz von Antigenen und durch Vermittlung von Entzündungsmediatoren zur Aktivierung von Phagozyten. Aus dieser Gruppe sind v.a. die Dendritischen Zellen zu nennen, die nach Antigeningestion in lymphatisches Gewebe einwandern und dort als sog. antigenpräsentierende Zellen dem adaptiven Immunsystem die phagozytierten Antigene mit Hilfe von Major Histocompatibility Complex (MHC) - Molekülen präsentieren. In Folge der Antigenpräsentation kommt es im lymphatischen Gewebe zu einer Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen, sowie zur Bildung von Antikörpern [96, 57]. Über diese Mechanismen erfolgt nun neben der unspezifischen Infektabwehr durch das angeborene Immunsystem ein spezifischer Angriff der als körperfremd erkannten Strukturen.

1.2 Immunologie der T-Lymphozyten

1.2.1 Grundlagen der T-Zell Immunologie und T-Zell Entwicklung

Die T-Lymphozyten gehören neben den B-Zellen zu den zellulären Bestandteilen der adaptiven Immunantwort. Namensgebend war der Ort der immunologischen Ausreifung, der Thymus. T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark im Rahmen der Hämatopoese aus einer oligopotenten lymphatischen Stammzelle. Noch als sehr frühe, unreife Zellen wandern T-Lymphozyten aus dem Knochenmark aus, zirkulieren im Blutkreislauf und wandern schließlich in den Thymus ein, um ihre Entwicklung zu immunkompetenten Zellen abzuschließen [69, 96].

T-Lymphozyten sind 6 - 8 μm große Zellen mit einem großen, runden Nukleus und einem schmalen basophilen Zytoplasmasaum [10]. Auf molekularer Ebene zeichnen sich T-Lymphozyten durch die Expression des Oberflächenmoleküls Cluster of Differentiation (CD)3 aus. Die Antigenerkennung wird über den T-Zell-Rezeptor vermittelt. Dieser ist ein monovalenter Rezeptor und besteht chemisch aus zwei Untereinheiten. Beim Menschen bestehen die T-Zell-Rezeptoren bei über 90 Prozent der T-Lymphozyten aus α/β - Untereinheiten, nur 3 bis 10 Prozent bestehen aus γ/δ - Untereinheiten. Die Untereinheiten bestehen jeweils aus der Kombination einer konstanten und einer variablen Region. Für die konstante Region kodieren C-Gensegmente, während die variable Region aus einer Kombination von V- D- und J-Gensegmenten besteht. Die Spezifitätsvielfalt der Antigenbindstellen des T-Zell-Rezeptors basiert auf der alternierenden Rekombination der

Gensegmente. Weitere Mechanismen, wie Insertion oder Deletion einzelner Nucleotide und aberrante Verknüpfung der Segmente, führen zu einer weiteren Steigerung der Vielfalt der T-Zell-Rezeptor-Diversität [57, 92, 96].

Durch die Expression von CD4 und CD8 lassen sich T-Lymphozyten weiter unterscheiden. CD4 und CD8 sind costimulierende Oberflächenantigene, die die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Molekül verstärken. Die CD8 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten interagieren über ihren T-Zell-Rezeptor mit Molekülen der MHC Klasse 1. Diese MHC-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers vor und exprimieren Fragmente von intrazellulären Proteinen. Eine Unterscheidung zwischen autologen und allogenen Peptiden erfolgt hierbei nicht. Erkennt die CD8 positive Zelle während der Interaktion ein unbekanntes Protein, leitet diese die Zerstörung der betreffenden Zelle ein [96, 80].

Die CD4 positiven, sog. T-Helfer Zellen, werden durch die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen aktiviert. Über einen MHC-Komplex der Klasse 2 exprimieren antigenpräsentierende Zellen phagozytierte Antigene und durch die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor der CD4 positiven Zellen wird die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten ausgelöst.

1.2.2 Zentrale und Periphere T-Zell Toleranz

Die Bildung der T-Lymphozyten findet im Knochenmark statt. In einem frühen Entwicklungsstadium wandern die Zellen aus dem Knochenmark aus und als Thymozyten in den Thymus ein. Hier findet mit dem Durchlaufen mehrerer Entwicklungsschritte die Reifung zu immunkompetenten Zellen statt [96].

Die am Anfang ihrer Entwicklung stehenden Thymozyten wandern in den subkapsulären Bereich der Rinde des Thymus ein. Die typischen Oberflächenmoleküle CD3, CD4 oder CD8 sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden. Im ersten Schritt kommt es zur Proliferation und Festlegung auf die T-Zell-Linie. Die Zellen exprimieren jetzt CD3 an ihrer Oberfläche. Darauf folgend kommt es zum T-Zell-Rezeptor-Rearrangement und damit zur Bildung der T-Lymphozyten mit α/β - oder γ/δ -Rezeptortyp sowie zur Ausbildung der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8. In diesem Stadium zeigen sich die Thymozyten für CD4 und CD8 doppelt positiv.

Nach Abschluss der Rezeptorkettenumlagerung und der Ausbildung der Oberflächenantigene treten die Thymozyten in Selektionsprozesse ein. Im inneren Rindenbereich findet die sog. positive Selektion statt. Hier werden den doppelt positiven Thymozyten MHC-Komplexe präsentiert. Erkennt eine Zelle keinen MHC-

Komplex, wird die Apoptose eingeleitet. Bei Erkennung eines MHC1-Komplexes differenziert sich die Zelle weiter zu einer für CD8 einfach positiven zytotoxischen T-Zelle. Wird ein MHC2-Komplex erkannt, kommt es zur Differenzierung in Richtung CD4 positiver T-Helfer-Zellen.

Im Folgenden kommt es zur sog. negativen Selektion in Cortex und Mark des Thymus. Hier werden von Dendritischen Zellen, Makrophagen und Thymus-Epithelzellen über MHC-Komplexe autologe Antigene präsentiert. Kommt es zur Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit einem körpereigenen Antigen, leitet die Zelle auch hier die Apoptose ein. Nach Abschluss der Selektionsschritte wandern die immunkompetenten T-Lymphozyten in die Blutbahn aus [96].

1.2.3 T-Zell Differenzierung und Klassifizierung CD4 positiver Zellen

Unter Antigenkontakt verändern sich bestimmte, auf der T-Zell Oberfläche gelegene, Antigene. Die CD4 positive T-Zelle unterliegt einer zunehmenden Differenzierung. Für die Unterscheidung werden die Expression von CD45 RO bzw. CD45 RA und von CD27 bestimmt.

CD45 ist ein Molekül, das auf allen hämatopoetischen Zellen detektierbar ist. Der intrazelluläre Anteil von CD45 ist eine Tyrosinphosphatase, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors spielt. CD45 dephosphoryliert die an das CD4-Molekül gebundene Kinase Lck, die im aktiven Zustand wiederum für die Signalübertragung des T-Zell-Rezeptor Komplexes essentiell ist. CD45 RA und CD45 RO sind Isoformen des selben Antigens, die durch alternatives Splicing entstehen und jeweils in bestimmten Differenzierungsstadien auf T-Lymphozyten exprimiert werden [96, 115].

CD27 ist ein costimulierendes Molekül, das sowohl auf T- als auch auf B-Zellen, Natürlichen Killerzellen sowie auf hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist und in der Anfangsphase der T-Zell Aktivierung eine bedeutende Rolle spielt. Der einzig bekannte Ligand CD70 wird auf antigenpräsentierenden Zellen, Natürlichen Killerzellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Die Interaktion von CD27 und CD70 verstärkt das T-Zell-Rezeptor Signal. Unter andauernder Stimulation kommt es zur Herunterregulation der CD27 Expression [44].

Anhand der Expression von CD45 und CD27 lassen sich unter den CD4 positiven T-Lymphozyten naive, Gedächtnis-, Effektor- und terminal differenzierte T-Lymphozyten unterscheiden. Als naive T-Lymphozyten werden antigenunerfahrene T-Lymphozyten bezeichnet, die die Selektionsschritte im Thymus über-

standen haben und als immunkompetente Zellen auf Antigenkontakt warten [96]. Diese Zellen exprimieren statt CD45RO die Isoform CD45RA und tragen das Oberflächenmolekül CD27 (CD45RO⁻ CD27⁺) [44, 7].

Aus den naiven T-Lymphozyten entwickeln sich bei jeder spezifischen Immunantwort nach Antigenkontakt die Gedächtnis- und Effektor-T-Lymphozyten. Effektor-T-Lymphozyten exprimieren CD45RO, aber kein CD27 auf ihrer Oberfläche (CD45RO⁺CD27⁻). Diese Zellen dienen der direkten Bekämpfung von Erregern und haben ein großes Zytokinrepertoire um ihre Funktion zu erfüllen. Bei der Erstinfektion sind sie entscheidend an der Bekämpfung von Erregern im Rahmen der primären Immunantwort beteiligt [96].

Die Gedächtniszellen können bei erneuter Infektion mit kürzerer Latenzzeit und höherer Qualität auf Erreger reagieren. Diese sog. sekundäre Immunantwort kann eine erneute Infektion verhindern oder zumindest abschwächen [96]. Zu den Gedächtniszellen werden die CD45RO⁺CD27⁺ T-Lymphozyten gezählt. Mit Hilfe der Expression des CC-Motiv-Chemokinrezeptor (CCR)7 können die Gedächtniszellen weiter in Zentrale-(CCR7⁺) und Effektor-(CCR7⁻)Gedächtniszellen unterteilt werden [7]. CCR7 gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und hat eine Funktion in der Migration von Immunzellen in lymphatische Gewebe. Daraus ergibt sich, dass Effektor-Gedächtniszellen im Blut zirkulieren und kurzfristig am Infektionsort Immunantworten auslösen können. Zentrale-Gedächtniszellen hingegen sorgen für eine schnelle Rekrutierung von Immunzellen und die Einleitung der Immunantwort im lymphatischen Gewebe [96].

Die CD4 positiven Helfer-T-Lymphozyten lassen sich weiterhin in verschiedene Subpopulationen unterteilen. Zu diesen gehören die TH1-, TH2-, TH17- und die regulatorischen T-Lymphozyten (siehe Abb. 1). Eine Zuordnung der Zellen gelingt aufgrund unterschiedlicher Zytokinmuster und Transkriptionsfaktoren. Die Zytokinmuster der jeweiligen Zellen korrelieren mit den unterschiedlichen Aufgabenfeldern der Subpopulationen [96].

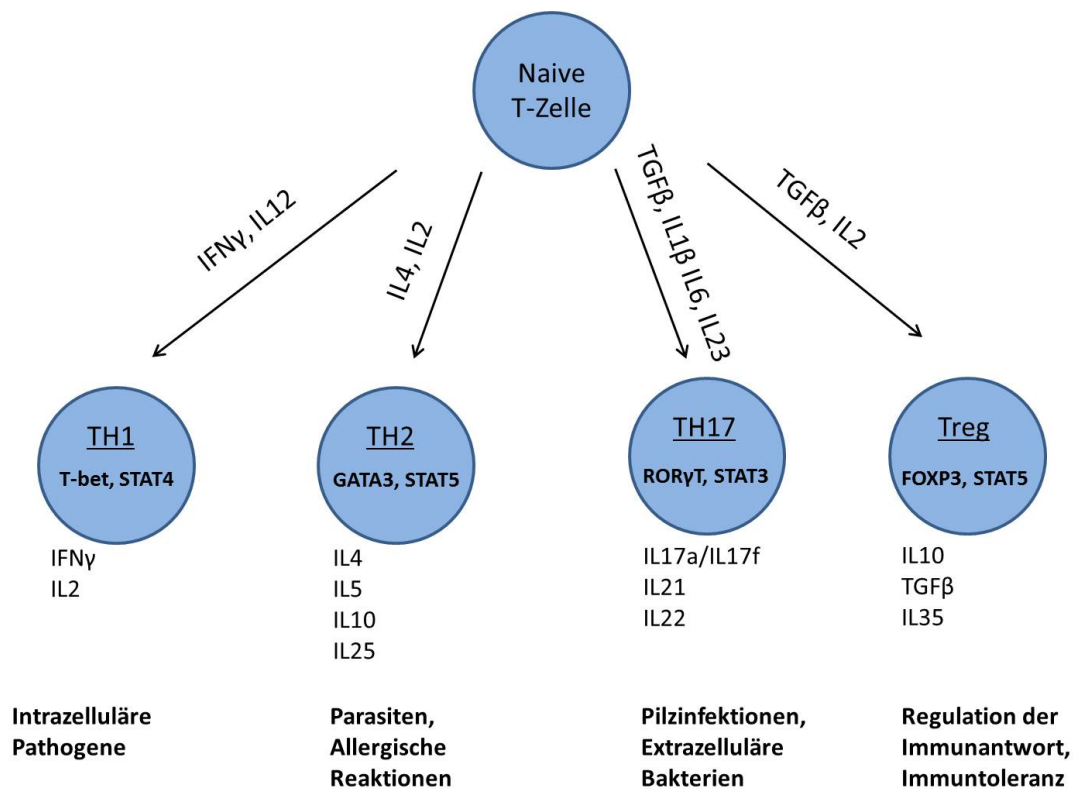


Abb. 1: Darstellung der T-Zell-Subpopulationen (modifiziert nach [1])

Das Kennzeichen der TH1-Lymphozyten ist die IFN γ -Produktion. Weitere produzierte Zytokine sind Interleukin (IL) 2 und TNF β . STAT1, STAT4 und T-bet gehören zu den für TH1-Zellen typischen Transkriptionsfaktoren. Diese Subpopulation ist vorwiegend beteiligt an der Bekämpfung von Viren und intrazellulären Bakterien. Weiterhin ist sie in der Lage B-Zellen zur Antikörperproduktion zu stimulieren [96].

TH2-Zellen weisen eine Produktion von Interleukin (IL)-4, aber auch IL-5, IL-6 und IL-13 auf. STAT6 und GATA lassen sich als Transkriptionsfaktoren finden. Diese Subpopulation bewirkt eine Aktivierung naiver B-Zellen und einen Antikörperklassenwechsel zu IgE und IgA [1, 96].

Das typische Zytokinprofil der TH17-Zellen weist neben der namensgebenden Interleukin (IL)17 Produktion eine Ausschüttung von IL21 und IL22 auf. ROR γ t und STAT3 sind als Transkriptionsfaktoren auffindbar. Die TH17-Zellen haben ihr Aufgabenfeld in der Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze [96].

Regulatorische T-Lymphozyten sind eine Untergruppe, die die Immunreaktion proinflammatorischer T-Lymphozyten unterdrückt. Vermittelt wird diese Immunsuppression durch die Produktion von Zytokinen wie IL10 oder TGF β . Der für regulatorische T-Lymphozyten dominante Transkriptionsfaktor ist Forkhead Box

Protein 3 (FOXP3) [96].

1.2.4 Funktion der CD 4 positiven T-Lymphozyten bei Primärer und Sekundärer Immunantwort

Die Primäre Immunreaktion findet in den peripheren lymphatischen Organen statt. Nach Austritt der T-Lymphozyten aus dem Thymus gelangen diese antigenunerfahrenen Zellen über postkapilläre Venolen (Hochendotheliale Venolen (HEV)) in ihre Zielregion. Durch Oberflächenmoleküle wird nach dem Erstkontakt das Abrollen, Anhaften und die Diapedese der naiven T-Lymphozyten bewirkt. Für das Anhaften sind Adhäsionsmoleküle wie L-Selektin (CD62L) verantwortlich. Auf der Oberfläche der HEV werden u.a. CC-Motiv-Chemokin Ligand (CCL)21 und CCL19 exprimiert. Beide interagieren mit dem auf naiven T-Lymphozyten vorhandenen CCR7. über diese Interaktion wird die Diapedese der Leukozyten in lymphatisches Gewebe bewerkstelligt. Innerhalb des lymphatischen Gewebes wandern die T-Lymphozyten in eine spezialisierte Zone, die sog. T-Zone [96].

In dieser T-Zone werden den T-Lymphozyten Antigene über MHC2-Komplexe der Dendritischen Zellen präsentiert. Durch Zell-Zell-Interaktion bilden Dendritische Zelle und T-Lymphozyt eine immunologische Synapse [39]. Abhängig von der Art des Antigens, der zellulären Umgebung und dem Zytokinmilieu induzieren die Dendritischen Zellen die Differenzierung der naiven T-Zelle zu TH1-, TH2-, TH17- oder regulatorischen T-Lymphozyten. Für die gerichtete Differenzierung sind sowohl das spezifische Erkennen eines Antigens durch den T-Zell-Rezeptor als auch die Aktivierung costimulierender Moleküle wie CD80 und CD86 auf der Oberfläche Dendritischer Zellen wichtig. CD80 und CD86 binden an CD28, ein costimulierendes Oberflächenmolekül auf T-Lymphozyten. Das Molekül CD28 bewirkt den Eintritt der T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus und u.a. eine Produktion von IL2. Die Reaktion der T-Zelle auf IL2 besteht in einer vermehrten Zellteilung, die klonale Expansion. Die Art der vorherrschenden Zytokine ist für die Ausbildung bestimmter T-Zell Subpopulationen entscheidend [39, 96].

Inhibierende costimulierende Moleküle wie CTLA-4, eine Veränderung des Zytokinmilieus und die Ausbildung regulatorischer T-Lymphozyten bewirkt im Verlauf eine Proliferationshemmung und verhindert eine überschießende Immunreaktion [96].

Kommt es nur zu einer Interaktion eines T-Zell-Rezeptors mit einem MHC-Molekül ohne Aktivierung costimulierender Moleküle, wie es z.B. bei der Erkennung von autologen Peptiden der Fall ist, kommt es nicht zu einer Aktivierung

der T-Zelle. Stattdessen wird diese Zelle entweder anerg oder geht in Apoptose [96].

Kommt es aber zur T-Zell-Rezeptor Aktivierung mit Costimulation entstehen Effektor- und Gedächtnis-T-Lymphozyten. Diese Zellen wandern über die Lymphbahnen in den Blutkreislauf und gelangen so an den Ort der Infektion. Die Einwanderung in infiziertes Gewebe ist aufgrund einer Änderung der Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren im Laufe der Differenzierung möglich. Chemotaktische Reizsignale für die Einwanderung werden durch bereits anwesende Immunzellen wie Granulozyten und Makrophagen sezerniert [96].

Im infizierten Gewebe angekommen, sezernieren die Effektor-T-Lymphozyten eigene Zytokine. Es kommt u.a. zur Ausschüttung von IL17, IL21, IL22, IFN γ und TNF α . Hierdurch kommt es zu einer vermehrten Produktion von Immunzellen, insbesondere Leukozyten des angeborenen Immunsystems. Ebenfalls über die sezernierten Zytokine wird die Rekrutierung in das entzündete Gewebe gewährleistet. Auf diese Art angelockte CD8 positive, zytotoxische T-Lymphozyten und B-Zellen unterstützen das angeborene Immunsystem durch direkte Zerstörung infizierter Zellen [96].

Als sekundäre Immunantwort wird die Reaktion des Immunsystems auf bekannte Antigene bei Sekundärinfektion bezeichnet. Hierbei ist initial nicht nur das angeborene, sondern auch das adaptive Immunsystem in die Infektabwehr involviert. Möglich ist diese sofortige Mitwirkung durch die bei Primärinfektion gebildeten antigenspezifischen Gedächtniszellen. Diese sofortige und aufgrund der klonalen Expansion bei der Primärinfektion auch stärkere Immunreaktion verhindert oder reduziert eine erneute Symptomatik [109].

1.2.5 T-Zell Homöostase: Proinflammatorische T-Lymphozyten und deren Regulation

1.2.5.1 TH1/TH2 Paradigma

Die Unterteilung der CD4 positiven T-Lymphozyten in eine TH1 und eine TH2 Subpopulation bestimmte lange Zeit das Verständnis der T-Zell vermittelten Immunologie. In dieser bereits im Jahr 1986 von *Mosmann et al.* [81] postulierten Dichotomie zeigte sich die IFN γ und IL2 produzierende TH1-Zelle verantwortlich für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene und die Aktivierung von Makrophagen. Die TH2-Zelle war verantwortlich für extrazelluläre Pathogene und Parasiten [128, 82].

Neben der physiologischen Funktion der Bekämpfung von Pathogenen wurden die CD4 positiven T-Lymphozyten auch mit Allergien und Autoimmunität in Verbindung gebracht. Es konnte eine Beteiligung von TH2-Zellen an der Auslösung von Allergien und damit assoziierter Erkrankungen wie Asthma bronchiale gezeigt werden [26], während TH1-Lymphozyten in der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem Diabetes mellitus Typ 1 oder dem Morbus Crohn involviert waren [128, 15].

Ein wichtiger Meilenstein in der Etablierung des TH1/TH2-Paradigmas war die Entdeckung, dass diese Subpopulationen in der Lage waren sich gegenseitig zu inhibieren [82]. Hinweise hierfür fanden sich auch darin, dass exogen zugeführtes IL4 ebenso wie Helmintheninfektionen, einem Trigger für die Differenzierung in TH2-Zellen, den Ausbruch eines mit TH1-Lymphozyten assoziierten Diabetes in Non-Obese-Diabetic (NOD)-Mäusen, einem Diabetes-Tiermodell, inhibieren konnten [91, 140].

Das dichotom basierte Modell der T-Helfer-Zell Immunität wurde durch weitere Forschungsergebnisse widerlegt. Harrington et al. beschrieben im Jahr 2005 eine dritte IL-17 produzierende T-Helfer-Zelllinie, die TH17-Zellen [45].

Weitere Fortschritte im Bereich der T-Zellforschung und insbesondere auf dem Gebiet der TH17-Zellforschung zeigten die deutlich komplexere Regulation der T-Zell-Immunologie. Mit weiteren Entdeckungen, wie der Beschreibung der Wirkung von IL23 [56] oder IL21 in Autoimmunkrankheiten, wurden immer weitere Puzzleteile aufgedeckt, ohne dass es gelang, das Gesamtbild der immunologischen Regulation zusammensetzen [128].

1.2.5.2 TH17-Zellen

Namensgebend für die von Harrington et al. im Jahr 2005 beschriebenen TH17-Zellen ist deren Interleukin 17 Produktion. Neben IL17A und IL17F produziert diese Zellgruppe auch IL21 und IL22 [111, 43].

TH17-Lymphozyten sind im Rahmen der Infektabwehr in die Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze wie z.B. *Candida albicans* (*C. albicans*) involviert [43, 120, 131, 96].

Für die Induktion von TH17-Zellen im menschlichen Körper ist ein komplexes, noch nicht endgültig entschlüsselttes Zusammenspiel diverser Signalkaskaden notwendig. Die Zusammensetzung des benötigten Zytokinmilieus wird weiterhin diskutiert.

Interleukin 1 β wird als essentieller Bestandteil für die Differenzierung mensch-

licher TH17-Lymphozyten angesehen [125, 104, 111, 2, 105], wobei *Sallusto et al.* eine spezifische Wirkung des IL1 β Einflusses für die Ausprägung IL17/IFN γ doppelt positiver T-Lymphozyten beschrieben haben [104].

Ebenso wie IL1 wird IL6 als wichtiger Faktor der T-Zell Differenzierung in Richtung IL17 positiver TH17-Lymphozyten angesehen. IL6 ist ein Akute-Phase-Protein, das die Induktion von FOXP3 inhibiert und so die Bildung von regulatorischen T-Lymphozyten unterdrückt [2, 11, 104, 125].

Die Rolle von TGF β in der Induktion von TH17-Lymphozyten wird weiterhin kontrovers diskutiert. *Awasthi et al.* beschrieben im Jahr 2008 die Kombination von TGF β mit IL6 als die prägende Zytokinkombination für die Induktion von TH17-Zellen [11]. Weitere Forschungsergebnisse bekräftigen die These, dass TGF β nicht nur im Mausmodell, sondern auch für die TH17-Differenzierung im Menschen eine Schlüsselrolle einnimmt [137, 72, 125]. Im Widerspruch hierzu beschrieben *Wilson et al.* 2007 eine reduzierte IL17A, IL17F und IL22 Produktion menschlicher T-Lymphozyten nach Stimulation mit TGF β [131]. Diese Ergebnisse wurden durch weitere Studien u.a. von *Acosta-Rodriguez et al.* bekräftigt [2, 104]. *Goreschi et al.* sprachen 2010 TGF β zwar eine stabilisierende Wirkung auf die Ausbildung des TH17-Phänotyps durch Inhibition der T-bet-Expression zu, sprachen aber gerade dieser Zellgruppe eine mangelnde Pathogenität im untersuchten Mausmodell zu [38].

Interleukin 23 (IL23) ist ein aus zwei Untereinheiten bestehendes heterodimeres Zytokin [62]. IL23 wird eine wichtige Rolle in der Förderung der IL17 Produktion durch TH17-Lymphozyten zugesprochen und beeinflusst die Proliferationskapazität der TH17-Zellen. *Aggarwal et al.* beschrieben, dass IL23 allerdings nicht als Initiator der TH17-Differenzierung anzusehen ist [4]. IL23 stabilisiert weiterhin die Differenzierung in TH17-Zellen und ist ein wichtiges Zytokin um das Überleben dieser Zellen zu sichern [4, 85].

Inwiefern Interleukin 21 für die Differenzierung zu TH17-Zellen notwendig ist, ist ebenfalls strittig. *Yang et al.* beschrieben im Jahr 2008 die Notwendigkeit der Anwesenheit von IL21 [137]. *Nurieva et al.* zeigten, dass IL21 als autokrines Signal Einfluss auf die TH17-Zellentwicklung nimmt [84]. Die Effekte von Interleukin 21 werden über die Hemmung der TGF β abhängigen Bildung FOXP3 positiver regulatorischer T-Lymphozyten [84, 60] und über die Hochregulation von IL23-Rezeptoren vermittelt [120]. Unter anderem bei *Zielinski et al.* und *Sallusto et al.* ist IL21 nicht als ein für die TH17-Differenzierung notwendiges Zytokin beschrieben [104, 144].

In TH17-Lymphozyten lässt sich weiterhin die Aktivität bestimmter Transkrip-

tionsfaktoren nachweisen. Aus Untersuchungen an Mäusen sind $ROR\gamma_t$ und $ROR\alpha$ bekannt. $ROR\gamma_t$ defiziente Mäuse zeigten eine stark beeinträchtigte TH17-Differenzierung. T-Lymphozyten von Mäusen, die $ROR\gamma_t$ und $ROR\alpha$ defizient waren, zeigten keinerlei Differenzierung zu TH17-Lymphozyten [55, 139, 5]. $ROR\gamma_t$ wird ebenfalls in humanen TH17-Zellen detektiert und führt bei seiner Expression zur Produktion von IL17A und IL17F sowie zu einer verminderten Ausschüttung von $IFN\gamma$. Gleichzeitig wird auch die Produktion von IL22 und $TNF\alpha$ gesteigert [3, 5].

Ein weiterer für die Differenzierung zu TH17-Lymphozyten wichtiger Transkriptionsfaktor ist der sowohl bei Mäusen, als auch bei Menschen vorkommende *Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)3*. Auch für diesen Transkriptionsfaktor konnte gezeigt werden, dass bei STAT3 defizienten Mäusen keine Differenzierung in TH17 Richtung stattfindet, während eine Überexpression zu einer verstärkten IL17 Produktion führt [5, 138].

Annunziato et al. beschrieben weiterhin im Jahr 2007 IL17 und $IFN\gamma$ doppelt positive T-Lymphozyten, die zusätzlich zu $ROR\gamma_t$ den Transkriptionsfaktor T-bet exprimierten [6, 5].

Interleukin 17 ist das Markerzytokin der TH17-Lymphozyten. Von humanen T-Lymphozyten werden die Isoformen IL17A und IL17F produziert. Für die Signaltransduktion bindet IL17 an den IL17-Rezeptor. Es sind 5 verschiedene Rezeptorisoformen bekannt (IL17RA-IL17RE). Die Interaktion von IL17A mit IL17RA allein ist nicht in der Lage eine suffiziente Signaltransduktion auszulösen. Die Signalweiterleitung durch IL17 wird über einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus IL17RA und IL17RC bewirkt. IL17F bindet ebenfalls an IL17RA. Während IL17A eine deutlich höhere Affinität für IL17RA aufweist als IL17F, zeigen beide Zytokine eine ähnliche Affinität für IL17RC [43, 54].

IL17A und IL17F üben ihre Funktionen in der Abwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze über die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Beeinflussung des Zytokinmilieus am Entzündungsort und Stimulation zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen aus.

Im IL17R defizienten Mausmodell konnte eine verminderte IL17 Wirkung mit einer erhöhten Anfälligkeit der Organismen für verschiedene Pathogene wie *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* oder *C. albicans* gezeigt werden [43, 27].

IL17A zeigt sich in den komplexen Abläufen der immunologischen Reaktionen als schwacher Aktivator von Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-cells ($NF\kappa B$), ist aber in der Lage durch synergistische Effekte mit

anderen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, einem starken $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivator, seine Wirkung zu entfalten. Die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ durch $\text{TNF}\alpha$ induziert die Bildung hochinstabiler proinflammatorischer Messenger Ribonuclein Acid (mRNA). Durch IL17 vermittelte Signaltransduktion wird das Produkt stabilisiert und damit die Expression proinflammatorischer Zytokine gefördert [43, 46].

IL17 vermittelt nach Interaktion mit dem IL17-Rezeptorkomplex über diverse Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen verschiedene Einflüsse auf das Immunsystem. Dieses führt u.a. zur Modulation von TRAF2, TRAF5, Act1, miR-23b oder IKKi und zeigte die Komplexität der IL17 vermittelten Signalwege auf molekularer Ebene [43].

1.2.5.3 Regulatorische T-Lymphozyten

Die Aktivierung proinflammatorischer Immunzellen schützt den Organismus vor Angriffen von Pathogenen. Dieser Schutz entsteht durch stark potente Mediatoren, die u.a. zu einer Zerstörung infizierter körpereigener Zellen führen. Die Potenz dieser Mediatoren ist an Immunreaktionen, wie man sie beim Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS), der Sepsis oder beim gefürchteten Zytokinsturm erlebt, zu erkennen [48, 118]. Diese im Fall der fehlgerichteten Immunreaktion entstehende destruktive Kraft des Immunsystems sieht man ebenfalls im Rahmen von Autoimmunerkrankungen.

Um eine Gefährdung des eigenen Organismus zu verhindern, unterliegt das Immunsystem einer komplexen Regulation. In diesem immuninhibierenden System spielen die regulatorischen CD4 positiven T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle. Phänotypisch zeichnen sich diese durch die Expression der α -Kette des IL2-Rezeptors (CD25) und des Transkriptionsfaktors Forkhead Box Protein 3 aus (CD25+FOXP3+) [64].

Die inhibitorischen Einflüsse der regulatorischen T-Lymphozyten auf das Immunsystem konnten in mehreren Studien belegt werden. *Sakaguchi et al.* zeigten im Jahre 1995, dass in einem bestimmten Mausmodell bei Gabe einer CD25 depletierten Zellsuspension diverse Autoimmunerkrankungen entstanden, während bei simultaner Gabe von CD4+CD25+ T-Lymphozyten der Ausbruch dieser Erkrankungen verhindert wurde [103].

Ein Mausmodell mit einer Mutation des FOXP3-Gens führte zum Ausbruch verheerender lymphoproliferativer Erkrankungen [64]. Beim Menschen lässt sich eine Mutation des FOXP3-Gens im Rahmen des IPEX (*Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*) Syndroms feststellen. Patienten mit

dieser äußerst seltenen Erkrankung des Immunsystems leiden an Diabetes, Thyreoiditiden, hämolytischen Anämien, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Ekzemen und bilden eine Vielzahl an Autoantikörpern aus [130, 64].

Die regulatorischen T-Lymphozyten lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen, die man anhand phänotypischer Merkmale aktuell nicht unterscheiden kann.

Die natürlichen regulatorischen T-Lymphozyten (nTreg) sind T-Lymphozyten, die ihre Differenzierung zu Regulatoren des Immunsystems im Thymus durchlaufen. Sie machen in etwa 1 - 2 % der peripheren CD4 positiven T-Lymphozyten im Menschen aus [64].

Die induzierten regulatorischen T-Lymphozyten (iTreg) entstehen in der Peripherie aus naiven T-Lymphozyten. Damit naive T-Lymphozyten sich zu regulatorischen T-Lymphozyten differenzieren ist neben einer adäquaten Stimulation des T-Zell-Rezeptors auch die Anwesenheit von Transforming Growth Factor Beta und IL2 notwendig. Die Anwesenheit von TGF β induziert unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und NFAT die Transkription von FOXP3 [33]. Weiterhin zeigten *Zheng et al.*, dass IL2 ebenfalls für die Induktion und v.a. das Überleben und die Expansion der regulatorischen T-Lymphozyten essentiell ist [143].

Für die Umsetzung der immunsuppressiven Funktionen beschrieben *Grant et al.* vier Basisfunktionen der regulatorischen T-Lymphozyten [40]:

Tregs beeinflussen die Reifung und Funktion von antigenpräsentierende Zellen (APC). Das Oberflächenmolekül CTLA 4 auf Tregs ist in der Lage die Expression der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den antigenpräsentierenden Zellen (APC) herunter zu regulieren und so die T-Zell Aktivierung durch APCs zu vermindern [21].

Regulatorische T-Lymphozyten beeinflussen proinflammatorische Effektor-T-Lymphozyten durch direkte Interaktion. Tregs sind in der Lage über Galectin-1 oder TRAIL-DR5 Zellen in die Apoptose zu führen [37, 94]. Mit Hilfe von Granzym A und B können Tregs Zielzellen durch Zytolyse zerstören [20].

Weiterhin sind Tregs in der Lage die Immunreaktion durch Beeinflussung metabolischer Stoffwechselwege zu inhibieren. Zum einen konsumieren sie große Mengen IL2, das proinflammatorischen T-Lymphozyten dann als Überlebensfaktor nicht zur Verfügung steht [98, 64]. Zum anderen können Tregs über CD39 und CD79 eine Degradierung extrazellulärer Nukleotide und damit eine Generierung von freiem Adenosin bewirken. Adenosin ist in der Lage die Funktion von Effektor-T-Lymphozyten zu supprimieren [40].

Als vierte Basisfunktion der Immunsuppression ist die Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine zu nennen. In Mausmodellen konnte die Beteiligung von IL10 und IL35 als antiinflammatorische Zytokine an der Prävention von Autoimmunerkrankungen wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt werden [9, 64, 40].

1.3 Diabetes mellitus Typ 1

1.3.1 Grundlagen des Diabetes mellitus Typ 1

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine Stoffwechselerkrankung, die über eine inflammatorische Zerstörung pankreatischer Beta-Zellen zu einem kompletten Insulinmangel führt [48, 87, 50].

Der Diabetes mellitus Typ 1 hat in Mitteleuropa und in den USA eine Inzidenz von 8 - 17 / 100.000 Einwohner. Die Inzidenzen in den skandinavischen Ländern Norwegen, Schweden und Finnland liegen höher (bis zu 35/100.000), während China und Japan mit 1 - 3 / 100.000 Einwohnern die geringsten Raten an Erkrankten aufweisen [87]. Im Verhältnis zum Typ 2 tritt der Diabetes mellitus Typ 1 deutlich seltener auf. Der Anteil an allen Diabetes Erkrankungen liegt bei ca. 5 - 10 % [87, 48].

Im Zuge eines T-Zell vermittelten Entzündungsprozesses kommt es zur sogenannten Insulinitis. Ab einer Zerstörung von mehr als 85 % der pankreatischen Beta-Zellen wird die Insulinitis klinisch manifest [87].

Ätiologisch lassen sich ein Diabetes Typ 1A und Typ 1B voneinander unterscheiden. Der Typ 1A entsteht aufgrund einer autoimmunologischen Genese. Beim Typ 1B lässt sich keine Genese feststellen. Dieser Typ wird auch als idiopathisch bezeichnet und wurde bisher hauptsächlich in Japan beobachtet [87, 48].

Klinisch manifestiert sich der Typ 1 Diabetes bei den Patienten mit Polyurie, Polydypsie, Gewichtsverlust, Müdigkeit und Exsikkose [87, 59]. Der Insulinmangel führt zu einer gestörten Resorption der Glukose in Muskel- und Fettzellen und zu einem Wegfall der insulinabhängigen Hemmung der Lipolyse. Als Folge dieser pathologischen Vorgänge entstehen eine Hyperglykämie und Elektrolytverschiebungen. Durch den Insulinmangel kann es in 15 - 25 % der Erstmanifestationen zu einer Ketoazidose mit potentiell letalem diabetischen Koma kommen. Die Ketoazidose ist Folge der durch den Insulinmangel entstehenden Lipolyse. Hierbei werden Ketonkörper wie Acetoacetat und 3-Hydroxybutyrat gebildet, die zu einer pH-Wert Erniedrigung führen [14, 59, 92, 116].

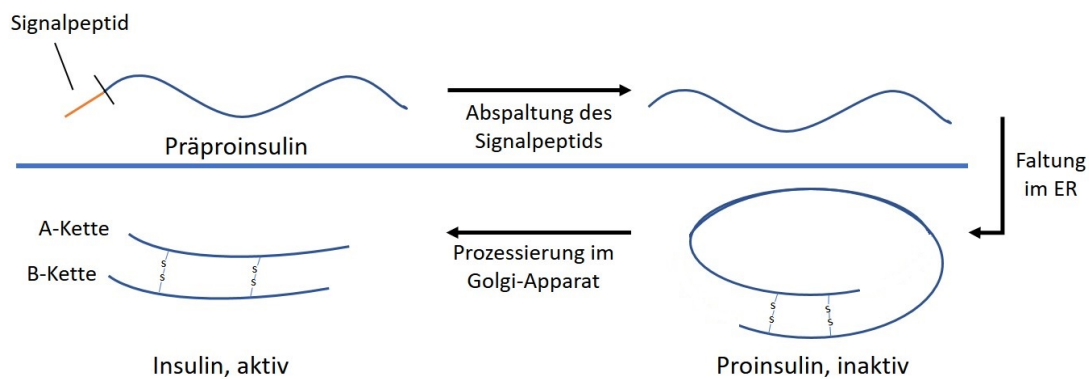


Abb. 2: Darstellung der Insulin-Synthese (modifiziert nach [2])

Im venösen Plasma zeigt sich eine Blutglukosekonzentration im nüchternen Zustand von ≥ 126 mg/dl oder ein 2-Stunden-Wert im Oralen Glukosetoleranztest von ≥ 200 mg/dl als diagnostisches Kriterium für einen Diabetes mellitus [50]. Labordiagnostisch zeigt sich beim Diabetes mellitus Typ 1 neben einer Erhöhung der Blutglukose eine starke Erniedrigung bzw. ein Fehlen des C-Peptides [86, 41]

Das C-Peptid entsteht im Rahmen der Insulinsynthese (siehe Abb. 2. Im endoplasmatischen Retikulum entsteht zunächst das Präproinsulin, das im Folgenden weiter zu Proinsulin prozessiert wird. Nachdem von diesem Proinsulin das C-Peptid proteolytisch abgespalten wurde verbleibt das aktive Hormon Insulin, ein Komplex aus zwei Peptidketten (A- und B-Kette), der durch Disulfidbrücken miteinander verbunden ist. Diese Prozessierung ist eminent wichtig für die biologische Aktivität, da das Proinsulin lediglich 1 - 3 % der biologischen Aktivität des Insulins aufweist [92, 28].

Weiterhin lassen sich beim Typ 1A Autoantikörper als Zeichen der autoimmun vermittelten Insulinitis detektieren. Neben Inselzellantikörper (ICA) und Insulinautoantikörpern (IAA) werden Autoantikörper gebildet gegen die Glutamat Decarboxylase der pankreatischen Beta-Zelle (GAD65), gegen die Tyrosinphosphatase (IA-2) und gegen den Zink Transporter 8 der Beta-Zellen (ZnT8) [14, 86, 50, 87].

Insulinautoantikörper lassen sich in bis zu 90 % der Typ 1A Erkrankungen feststellen. Es zeigt sich hierbei eine starke Altersabhängigkeit: Mit steigendem Alter sinkt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieser Antikörper [106, 14]. IA2- und GAD65- Autoantikörper lassen sich in 65 - 80 % der Patienten feststellen [110, 14]. Antikörper gegen ZnT8 sind in 60 - 80 % der Patienten nachzuweisen und Inselzellantikörper konnten bei 60 - 90 % der Erkrankten nachgewiesen werden [14].

Beim Diabetes mellitus Typ 1 zeigte sich eine starke Assoziation zu bestimm-

ten HLA-Molekülen. Eine genetische Prädisposition zu HLA-DR3 und HLA-DR4 liegt bei 95 % der Typ 1 Patienten vor [42]. Weiterhin liegt bei 20 % der Patienten eine positive Familienanamnese vor [48]. Trotzdem zeigt sich die genetische Komponente nicht allein für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich. Bei eineiigen Zwillingen konnte man zeigen, dass nur 35 - 50 % der Geschwisterkinder eines an Typ 1 Diabetes leidenden Menschen ebenfalls erkrankten [42, 48, 87]. Das Erkrankungsrisiko für HLA-identische Geschwister liegt bei ca. 18 %, für HLA-haplotypidentische Geschwister beträgt das Risiko ca. 6 %. Bei Geschwistern, die unterschiedliche HLA-Expressionsmuster aufweisen, findet sich ein kaum erhöhtes Risiko zu erkranken [48].

1.3.2 Rolle der TH17-Treg Homöostase beim Typ 1 Diabetes Mellitus

Die Beteiligung von T-Lymphozyten bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 im Rahmen der Insulitis ist vielfach belegt und unstrittig [111, 128, 42]. Traditionell wurde im Rahmen des *TH1/TH2 Paradigmas* (siehe Kap. 1.2.5.2) den TH1-Lymphozyten eine entscheidende Rolle an der Initiierung der Insulitis zugesprochen. $\text{IFN}\gamma$ wurde als das zentrale Zytokin in der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 angesehen. Entsprechend hierzu konnte eine Korrelation von steigenden $\text{IFN}\gamma$ -Werten und der Progression des Diabetes in NOD-Mäusen gezeigt werden [128]. Bei Förderung eines durch IL4 bestimmten Zytokinmilieus hingegen konnte ein Ausbruch des Diabetes in NOD-Mäusen verhindert bzw. aufgehalten werden [91, 83].

Eine Vielzahl an Studien schien die These, dass $\text{IFN}\gamma$ das Leitzytokin der autoimmunen Insulitis darstellt zu erhärten [128]. Diverse weitere Studien, die bspw. eine deutlich stärkere Beteiligung von TH2-Lymphozyten im Entzündungsfokus propagierten, deuteten darauf, dass eine deutlich komplexere (Fehl-)Regulation an der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 1 beteiligt ist [12, 128].

Die von *Harrington et al.* entdeckten TH17-Zellen und deren Regulation sind in den Fokus der Erforschung des Diabetes mellitus Typ 1 gerückt. Mehrere Studien legen eine Dysbalance in der Regulation der TH17-Lymphozyten nahe.

In NOD-Mäusen wurden erhöhte IL17 Werte in der histologischen Untersuchung des Pankreas gefunden [111]. Außerdem konnte in bestimmten *in vitro* Versuchsansätzen in Mäusen ein Diabetes durch Gabe von TH17-Zellen ausgelöst werden. Allerdings zeigte sich hier eine Diabetes Induktion erst nach Konversion von TH17-Zellen in $\text{IFN}\gamma$ produzierende TH1-Lymphozyten [74, 128, 111]. Im

Mausmodell konnte eine Beteiligung der TH17/IL17-vermittelten Immunantwort gezeigt werden, in wie weit diese für die Induktion eines Diabetes mellitus Typ 1 notwendig sind, verbleibt unklar [128].

Im Menschen konnten Studien eine Korrelation zwischen einer gesteigerten TH17/IL17-Immunreaktion und dem Ausbruch eines Diabetes mellitus Typ 1 feststellen [52, 111]. Zu diesen Ergebnissen passend, konnten *Bradshaw et al.* zeigen, dass Monozyten von an Diabetes erkrankten Menschen erhöhte mRNA-Level für IL6 und IL1 β aufwiesen [16]. *Ferraro et al.* wiesen 2011 ein vermehrtes Vorkommen von TH17 Zellen in pankreatischen Lymphknoten von Diabetikern im Vergleich zu gesunden Menschen nach [34].

Sicher scheint auch, dass die Zerstörung der β -Zellen im Pankreas durch autoreaktive Immunzellen ausgelöst wird. Die Selektion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus im Rahmen der Differenzierung wird zentrale Immuntoleranz genannt. Durch diese negative Selektion sollen autoreaktive T-Lymphozyten eliminiert werden. Einige dieser Lymphozyten, die auf eigene Peptide reagieren, können jedoch der Selektion im Thymus entgehen und in den peripheren Blutkreislauf gelangen [23]. Um diese auch in gesunden Individuen vorkommende Fehlselektion abzusichern, werden autoreaktive T-Lymphozyten in der Peripherie von regulatorischen T-Lymphozyten supprimiert [32].

Askenasy et al. beschrieben im Jahr 2013, dass die Suppression von Autoreaktivität ein Hauptfaktor der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 ist [8]. Weitere Studien zeigten, dass der Mangel oder funktionelle Defekte der regulatorischen T-Lymphozyten zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen wie dem Diabetes mellitus Typ 1 führen [32].

Die Frequenz der regulatorischen T-Lymphozyten in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. *Kukreja et al.* beschrieben 2002 erniedrigte Frequenzen von CD4+CD25+ T-Lymphozyten sowohl in Patienten mit Erstmanifestation eines Diabetes, als auch in Patienten mit länger bestehender Erkrankung [61]. Im Gegensatz dazu stehen Studien, u.a. von *Brusko et al.*, die keinen Unterschied in den Frequenzen der regulatorischen T-Lymphozyten zwischen gesunden und erkrankten Menschen feststellen konnten und eine funktionelle Störung nahelegen [17, 18, 65].

Die Vielzahl der vorhandenen Studien mit teils gegenläufigen Ergebnissen zeigt die Komplexität der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1. Zusammengefasst liegt der Insulinitis als Entstehungsprozess des Diabetes mellitus Typ 1 eine Störung der Homöostase der T-Zell Immunität zu Grunde. In wie weit die über-

schießende Reaktion proinflammatorischer T-Lymphozyten oder die mangelnde Kontrolle durch regulatorische T-Lymphozyten den Entstehungsprozess initiieren ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.4 *Candida albicans* als opportunistischer Erreger

1.4.1 Grundlagen *C. albicans*

Candida albicans ist ein Hefepilz und gehört zu der Untergruppe der Hemiaskomyzeten. Dieser Hefepilz findet sich auf Pflanzen (v.a. in Bereichen mit Nektar oder überreifem Obst), dem Erdboden oder dem Darmtrakt von Insekten [117].

Candida albicans ist der häufigste Erreger der Candidose und wurde zum ersten Mal im Jahre 1853 von C. Robin beschrieben. Etwa 80% der Menschen sind mit diesem Kommensalen besiedelt. Eine Besiedelung liegt v.a. im Bereich des Gastrointestinaltraktes vor und verursacht in der Regel keine Erkrankung. Eine Candidose entsteht nur bei Vorhandensein prädisponierender Faktoren wie z.B. einer Beeinflussung des Immunsystems im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 1 [87]. Vorzugsweise kommt es zu mukokutanen Candidosen, am häufigsten zu Mundsoor und Vaginalcandidose [117].

Der Infektion im mukokutanen Bereich liegt die über Glykoproteine vermittelte besondere Adhäsionsfähigkeit von *C. albicans* zu Grunde. Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist die Plastizität von *C. albicans*. Hierzu zählt sowohl die Ausprägung und der Wechsel zwischen zwei Zelltypen (White und Opaque), als auch die Umwandlung aus der Sprossform in die Hyphenform. Nur in der Hyphenform kann *C. albicans* die Interzellularräume des Epithels infiltrieren und Zugang zu den Blutgefäßen erlangen [117].

Der Mundsoor ist die zweithäufigste Schleimhautmykose und zeigt sich klinisch mit stippchenförmiger Gingivitis, Rötung, Ulzerationen und konfluierenden Belegen. Im Rahmen der häufig bei Frauen im gebärfähigen Alter auftretenden Vaginalmykose kommt es zu Brennen, starkem Juckreiz und vaginalem Ausfluss [117, 87].

Seltene Formen stellen die zusammen mit Endokrinopathien auftretende und auf eine Störung des zellulären Immunsystems zurückgehende seltene chronische mukokutane Candidiasis sowie die disseminierte Candidiasis dar [117].

Die topische Behandlung der Mykose kann mit Butoconazol, Nystatin, Clotri-

mazol, Ketoconazol oder Miconazol erfolgen. Bei Notwendigkeit einer systemischen Therapie wird eine hochdosierte Fluconazolmedikation eingesetzt, in kritischen Situationen werden Patienten auch mit antimykotisch wirkenden Echinocandinen behandelt [87, 117].

1.4.2 Infektion mit *C. albicans* im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 1

Patienten, die an Diabetes mellitus leiden, erkranken häufiger an durch *C. albicans* ausgelösten opportunistischen Infektionen wie dem Mundsoor oder der Vaginalmykose [87, 48]. Die diesen Mykosen zu Grunde liegende Störung ist unklar. Die Tatsache, dass *C. albicans* Infektionen sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1, als auch mit Typ 2 vorkommen legt den Fokus auf eine Assoziation mit einem erhöhten Blutglukosespiegel.

Andererseits ist unklar, in wie weit beim Diabetes mellitus Typ 1 eine Störung des Immunsystems an der Entstehung der Mykose beteiligt ist. *Huang et al.* beschrieben im Jahr 2004 die Rolle der T-Zell Immunologie für den Schutz gegen Infektionen mit *C. albicans*. Es zeigte sich, dass Mäuse, bei denen die Expression von IL17 oder des IL17-Rezeptors genetisch ausgeschaltet waren, deutlich anfälliger für Mykosen waren als die Kontrollgruppen [53, 43]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Störungen der IL-17 vermittelten T-Zell Immunität auch im Menschen für eine erhöhte Infektionsanfälligkeit verantwortlich sind [90, 43].

Die TH17/IL17 Immunologie und deren Homöostase ist stark mit der Infektionsanfälligkeit mit *C. albicans* verknüpft und weist ebenfalls eine mögliche Beteiligung in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 auf (siehe Kap. 1.3.2).

1.5 Ziele der Arbeit

Zentrales Thema der Promotionsarbeit ist die Erforschung grundlegender quantitativer und qualitativer Eigenschaften von T-Lymphozyten von Typ 1 Diabetikern mit Erstmanifestation der Erkrankung und länger bestehendem Typ 1 Diabetes im Vergleich zu gesunden, altersentsprechenden Kontrollpersonen. Der Fokus der Arbeit liegt dabei auf der Analyse von naiven T-Lymphozyten und ihrer Polarisierbarkeit in proinflammatorische TH17-Zellen und regulatorische T-Lymphozyten (Tregs), die die Inflammation unterdrücken können.

Die kontroversen Diskussionen bezüglich der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 und dem Ausmaß der Beteiligung verschiedener Bestandteile des Immunsystems wurden bereits beschrieben (siehe Kap. 1.3.2) und zeigen das mangelnde Verständnis der Pathogenese des Diabetes. Der Einfluss proinflammatorischer T-Lymphozyten und deren Regulierung in der Entstehung des Diabetes soll in dieser Arbeit durch Simulation einer das Immunsystem stimulierenden Situation im Vergleich zwischen Diabetikern und gesunden Kontrollpatienten untersucht werden, um weitere Erkenntnisse zur Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 zu gewinnen.

Übergeordnetes Ziel der Arbeit ist es über eine Analyse der Polarisierbarkeit peripherer T-Lymphozyten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 nicht nur neue Erkenntnisse in Bezug auf die Pathogenese zu gewinnen, sondern auch mögliche neue Angriffspunkte für die Entwicklung von Therapien zu identifizieren, um die inflammatorisch bedingte Zerstörung der Insulin produzierenden Zellen im Pankreas zu verhindern.

Hierzu sollten im experimentellen Versuchsansatz bei Stimulation unter den in Kapitel 2.6 genannten Kulturbedingungen folgende Fragestellungen untersucht werden:

- a) Wie stellt sich die Verteilung der naiven, Memory-, Effektor- und terminalen T-Lymphozyten nach Stimulation dar und welche Unterschiede finden sich zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?
- b) Zeigen sich Unterschiede in der proinflammatorischen Antwort (charakterisiert durch die Produktion von IL17 und $\text{IFN}\gamma$) zwischen den Gruppen in Folge der Stimulation?
- c) Gibt es Unterschiede in der Proliferationsaktivität (charakterisiert durch die Expression von Ki67) der proinflammatorischen, IL17 und $\text{IFN}\gamma$ pro-

duzierenden T-Zellen in Folge der Stimulation zwischen den Patienten mit Diabetes und den Kontrollpatienten?

- d) Zeigen sich Unterschiede in der quantitativen Verteilung von regulatorischen T-Lymphozyten (CD25+FOXP3+) nach Stimulation?
- e) Zeigen sich Unterschiede in der proliferativen Aktivität (charakterisiert durch Expression von Ki67) der Tregs zwischen den Gruppen?
- f) Gibt es Unterschiede in der Zytokinproduktion von IL10 und IL17 durch Tregs zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?
- g) Zeigt sich für die Untergruppe der CD127 negativen Tregs (CD25+FOXP3+CD127-) ein differentes Verhalten bezüglich der quantitativen Verteilung oder der Ausprägung der IL10-Produktion?
- h) Gibt es Unterschiede in der Expression des Oberflächenmoleküls CD62L auf den Tregs zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?
- i) Zeigen sich Unterschiede in der Expression des IFN γ -Rezeptors auf der Gesamtheit der T-Zellen nach Stimulation zwischen den Gruppen?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Dissertation verwendeten Geräte aufgelistet (siehe Tab. 1).

Gerät	Handelsname	Hersteller	Lot. Nr.
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	
Inkubator	Nuaire IR Autoflow, CO2 Water Jacketed Incubator	Varolab, Giessen Deutschland	995022
Kühlschrank	Comfort -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz	
	Hera Freeze -80°C	Thermo Fisher, Langensfeldbold, Deutschland	1013508
Sterilbank	Gelaire BSBS 6A	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland	11031
Zentrifuge	Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland	1610
	Rotanta/K	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland	
	RotixaP	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland	
Waage		Denver Instrument, Bohe-mia, USA	3001428
Mikroskop	Phase Contrast LWD o52	Nikon, Tokio, Japan	132485
Pipettiergerät	Research plus 10 ul	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	492499Z
	Research plus 100 ul	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	493057Z
	Research plus 200 ul	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	379067Z
	Research plus 1000 ul	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	494528Z
	Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	3033181
Vortex-Mischgerät	RetschMixer	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland	
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland	
Zellseparator	QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-090-976

Tab. 1: Verwendete Geräte

In dieser Tabelle sind die für die Versuche verwendeten Pufferlösungen aufgelistet (siehe Tab. 2).

Puffer	Handelsname	Hersteller	Lot. Nr.
Nährmedium	X-Vivo-15	Lonza	04-418
	RPMI 1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R8758
	Penicillin Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	A 2213
	FCS (Fetales Kälber Serum)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA	10270-160
Pufferlösungen	PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P-9144
	ETDA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E-5134
	DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D8418-50ML
	BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A2058-1G
	Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland	114558061
	Fixationspuffer	Cytofix	Biologend, San Diego, USA
Permeabilisierungspuffer	Cytoperm	Biologend, San Diego, USA	421002

Tab. 2: Verwendete Pufferlösungen

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Studie verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet (siehe Tab. 3).

Verbrauchsmaterialien	Handelsname	Hersteller	Lot. Nr.
Petrischalen	Cellstar, Tissue Culture Dishes, PS, 60 x 15 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	628160
	Cellstar, Tissue Culture Dishes, PS, 94 x 16 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	
	Cellstar 96 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	
	Cellstar 48 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	
	Cellstar 24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	
	Falcon Tubes	Cellstar, 15 ml	
	Cellstar, 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	227261

Eppendorf Tubes	SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.706
	SafeSeal 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.695.500
Glaspipette	Cellstar, 10 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	607 180
Pipetten-Spitzen	Biosphere Filter tips 10 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.760.210
	Biosphere Filter tips 100 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.760.212
	Biosphere Filter tips 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.760.211
Filter	Cell-Strainer 5 ml Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	352235
Cryo Tubes	Cryos	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	
Einfrier-Box	Cryo Freezing Container	Nalgene, Rochester, USA	51000001
FACS Tubes	FACS Round-Bottom Tubes 5 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	352008
MACS Columns	MACS Separation Columns 25 LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-401
	MACS Separation Columns 25 MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-201

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

In dieser Tabelle sind die verwendeten gebrauchsfertigen Medien dargestellt (siehe Tab. 4)

Gebrauchsfertige Medien	Zusammensetzung
FACS-Puffer	0,5 % BSA + 0,01 % Natriumazid + PBS + 500ml Aqua dest.
MACS-Puffer	0,5 % BSA + 2 mM EDTA + PBS + 500ml Aqua dest. (Ziel-pH: 7,2)
Erythrozyten-Lysis-Puffer	8,26 g Ammoniumchlorid + 1 g Kaliumbicarbonat + 0,037 g EDTA + 1 l Aqua dest. (Ziel-pH: 7,3)
Einfriermedium	RPMI + 20 % FCS + 10 % DMSO
PBS	1 Tablette für 500 ml Volumen (aufgelöst in Aqua dest.)

Tab. 4: Gebrauchsfertige Medien

In dieser Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien zur Zellstimulation aufgelistet (siehe Tab. 5).

Handelsname	Hersteller	Lot. Nr.	Klon
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P81391-1MG	
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I9657-1MG	

Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B6542-5MG	
CFSE (Carboxyfluoreszein-Succinimidylester (CFSE))	Biolegend, San Diego, USA	423801	
Anti-CD3	Biolegend, San Diego, USA	317315	OKT3
Anti-CD28	Biolegend, San Diego, USA	302923	CD28.2
PepTivator C. albicans	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	5131211319	MP65

Tab. 5: Zell-Stimulation

In dieser Tabelle sind die für die Zellseparation verwendeten Materialien aufgelistet (siehe Tab. 6).

Zellseparation	Handelsname	Hersteller	Lot. Nr.
Magnetische Zellseparation	CD4plus T Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130096533
	CD4plus Naive T Cell Isolation Kit II (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130094131
	CD25 MicroBeads II (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130092983
Dichtegradientenseparation	FicoLite-H (Human)	Linaris, Dossenheim, Deutschland	151122P

Tab. 6: Zellseparation

In dieser Tabelle sind die für die Durchflusszytometrie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe aufgelistet (siehe Tab. 7)

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller	Lot. Nr.	Kat.	Klon
CD4	PE	BioLegend, San Diego, USA	B142769	317410	OKT4
CD25	FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	7798	345796	2A3
CD27	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B153824	124216	LG.3A10
CD45RO	PerCP Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA	B114906	304222	UCHL1
CD45RA	BV 421	BioLegend, San Diego, USA	B140325	304130	HI100
FoxP3	PerCP Cy5.5	eBiosciences, FFM, Deutschland	E14134-101	45-4776-42	PCH101
IFN γ	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	5030228020	120000863	4S.B3

IL10	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	87108	554707	JES3-19F1
IL17A	Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, USA	B132984	512318	BL168
IL17A	BV 421	BioLegend, San Diego, USA	B143857	512321	BL168
IFN γ -R	PE	BioLegend, San Diego, USA	B152748	308504	2HUB-159
Ki67	APC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	81335	550968	DX12
CD62L	APC-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B133139	304813	DREG-56
CD127	BV 421	BioLegend, San Diego, USA	B154560	351310	A019D5

Tab. 7: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

In dieser Tabelle sind die in dieser Arbeit für die Zellkultur verwendeten Zytokine aufgelistet (siehe Tab. 8).

Zytokin	Beschreibung	Hersteller	Kat.
IL-1 β	Interleukin-1 β	Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland	11340013
IL-2	Interleukin 2	Biolegend, San Diego, USA	589106
IL-6	Interleukin-6	Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland	11340064
IL-23	Interleukin-23	Biolegend, San Diego, USA	574102
TGF- β	Transforming Growth Factor β	Biolegend, San Diego, USA	580702

Tab. 8: Verwendete Zytokine

2.2 Probanden

Für diese Studie wurden zelluläre Bestandteile des Blutes von menschlichen Probanden verwendet. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Würzburg unter dem Ethikvotum 239/10 genehmigt. Die vorliegende Studie wurde nach den Kriterien der *Deklaration von Helsinki 2013* [132] sowie den Maßgaben der *Good Clinical Practice* und der *Good Laboratory Practice* durchgeführt. Alle teilnehmenden Probanden wurden vor Blutabnahme in einem ausführlichen Gespräch und mittels eines Informationsblattes über die Inhalte und Chancen der Studie sowie über die mit der Blutabnahme verbundenen Risiken aufgeklärt. Die Einwilligung in die Durchführung erfolgte schriftlich. Die Blutabnahmen fanden im Rahmen von Routine-Blutabnahmen in der Universitäts-Kinderklinik der Universitätsklinik Würzburg, der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Würzburg oder im Rahmen arbeitsmedizinischer Untersuchungen (Betriebsärztlicher Dienst der Universität Würzburg) statt.

Bei den Diabetes Patienten wurden die Lymphozyten von insgesamt 15 Personen in den Zellkulturexperimenten untersucht. Jeweils 5 Personen in den Gruppen der erwachsenen Diabetiker, der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 und der Kindern mit einem längere Zeit bestehendem Diabetes (Krankheitsdauer ≥ 6 Monate seit Erstdiagnose). Für die Suppressionsversuche wurden jeweils 2 Personen pro Gruppe ausgewählt. Die Altersgrenze zur Unterscheidung zwischen erwachsenen Probanden und Kindern wurde bei 18 Jahren definiert. Die für diese Studie verwendeten Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 9 dargestellt.

Bei den Kontrollpatienten wurden altersentsprechende Vergleichsprobanden aus einem Pool gesunder Spender ausgewählt. Die Ein- und Ausschlusskriterien für die gesunden Kontrollpatienten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Einschlusskriterien

Diagnostizierte Erkrankung an einem Diabetes mellitus Typ 1

Ausschlusskriterien

Maligne oder hämatologische Erkrankungen
Impfungen innerhalb der vorausgehenden 4 Wochen vor Blutentnahme
Schwere Infektionen innerhalb der letzten 3 Monate
Schwere Allergien
Patienten bei denen eine Transplantation durchgeführt wurde
Unter immunsuppressiver Therapie stehende Patienten
Patienten mit genetisch determinierten Syndromen (bspw. DiGeorge-Syndrom, Down-Syndrom, u.a.)
Gabe von Blutprodukten innerhalb der letzten 3 Monate

Tab. 9: Die Abbildung zeigt die Ein- und Ausschlusskriterien der für die Studie verwendeten erkrankten Probanden

Einschlusskriterien

Routine-Blutabnahme ohne vorliegende Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien

Maligne oder hämatologische Erkrankungen
Impfungen innerhalb der vorausgehenden 4 Wochen vor Blutentnahme
Schwere Infektionen innerhalb der letzten 3 Monate
Schwere Allergien
Patienten bei denen eine Transplantation durchgeführt wurde
Unter immunsuppressiver Therapie stehende Patienten
Patienten mit genetisch determinierten Syndromen (bspw. DiGeorge-Syndrom, Down-Syndrom, u.a.)
Autoimmunerkrankungen
Stoffwechselerkrankungen
Gabe von Blutprodukten innerhalb der letzten 3 Monate

Tab. 10: Die Abbildung zeigt die Ein- und Ausschlusskriterien der für die Studie verwendeten Kontroll-Probanden

2.3 Präparation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

2.3.1 Isolierung aus Vollblut mittels Ficoll Paque

Ficoll-Paque ist ein Sucrose-Polymer, das im Rahmen der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation als Trennmittel fungiert. Aufgrund der Dichteigenschaften der über Epichlorhydrin kreuzvernetzten, stark verzweigten Saccharosemonomere können mononukleäre Zellen abgetrennt werden. Die Erythrozyten, Granulozyten sowie vorhandener Zelldetritus treten während der Zentrifugation durch die *Ficoll*-Phase hindurch und sammeln sich am Boden des Zentrifugationsröhrchens. Oberhalb davon findet sich die *Ficoll*-Phase und darüber die Interphase, die die mononukleären Zellen enthält. über der Interphase findet sich nach dem Prozess das Blutplasma (siehe Abb. 3) [70].

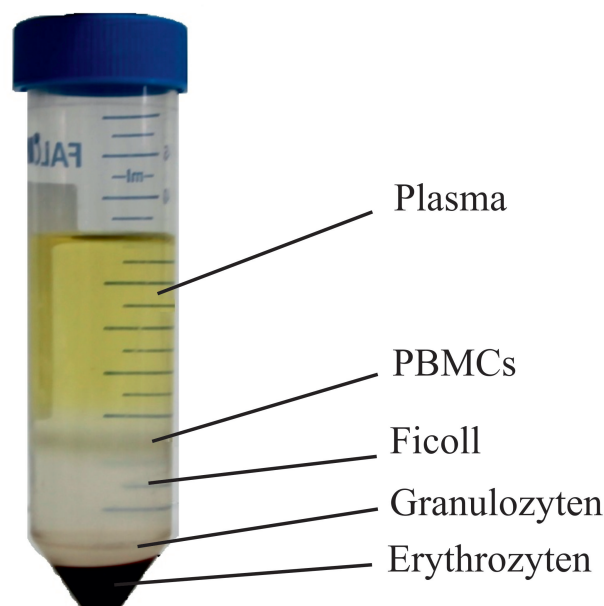


Abb. 3: Phasenverteilung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll

Zur Durchführung wurde das Vollblut eines Spenders vorsichtig in einem 50 Milliliter (ml) Zentrifugenröhrchen im Verhältnis 2:1 über eine Phase *Ficoll-Paque* geschichtet und bei 1500 Umdrehungen pro Minute (U/Min) ohne eingestellte Bremse zentrifugiert. Hiernach wurde die sich abzeichnende Interphase vorsichtig abpipettiert und mit NaCl-Lösung gewaschen (Auffüllen des Zentrifugenröhrchens auf 50ml Gesamtvolumen) und mit 1700 U/Min 10 Minuten zentrifugiert. Der

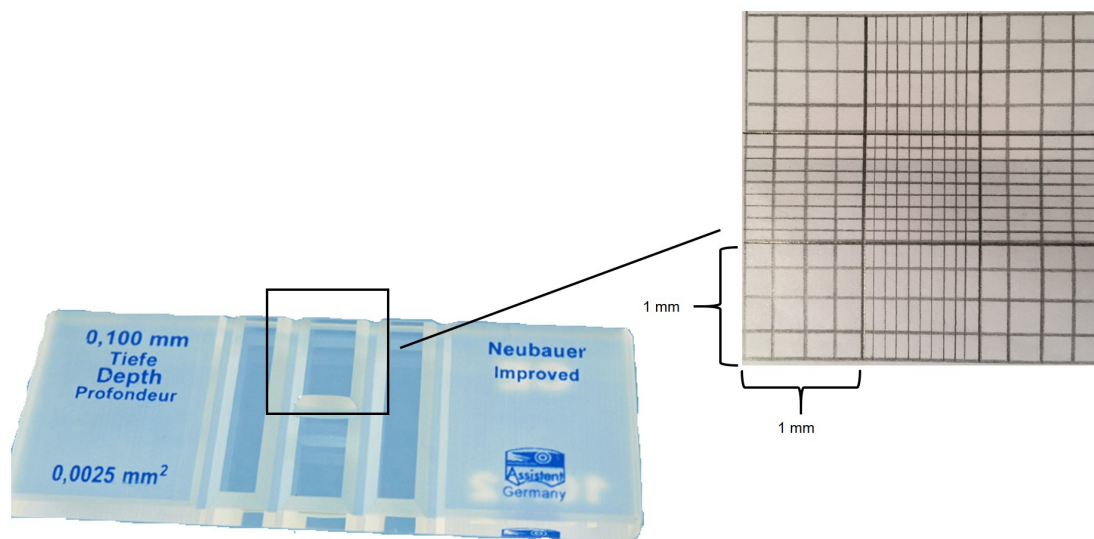


Abb. 4: Darstellung einer Neubauer-Zählkammer

Überstand wurde verworfen, die verbleibende Zellphase wurde für 5 Minuten mit 5ml *Ery-Lysis*-Puffer inkubiert, um verbliebene Erythrozyten zu eliminieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung in einem 1:1 Verhältnis mit dem Nährmedium RPMI-1640 verdünnt und erneut mit 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Zellpellet mit 5ml RPMI-1640 resuspendiert.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl und die Beurteilung der Vitalität wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Unter der Voraussetzung, dass sich die Deckplatte in korrekter Lage befindet, bildet sich eine Tiefe von 1 mm zwischen Deckplatte und Zählkammer. Der korrekte Sitz der Deckplatte wird durch Evaluation der *Newtonschen Ringe* überprüft. In der Zählkammer finden sich 4 Großquadrate mit einer Fläche von 1 mm^2 . Aus dieser Fläche und der beschriebenen Tiefe ergibt sich ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ pro Großquadrat (siehe Abb. 4).

Von der zu untersuchenden Zellsuspension wurde nach gewissenhaftem Durchmischen eine Probe entnommen. Diese wurde mit *Trypanblau* versetzt. Abhängig von der zu erwartenden Zellzahl wurde das *Trypanblau* in den Verhältnissen 1:1 bis 1:10 hinzugefügt.

Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff. Mit seiner Molekularmasse von $960,8 \text{ g/mol}$ kann *Trypanblau* nicht durch intakte Zellmembranen lebendiger Zellen diffundieren. Da die Zellmembran avitaler Zellen aber durchlässig ist, zeigen

sich alle abgestorbenen Zellen mit *Trypanblau* angefärbt. Aufgrund zytotoxischer Effekte des *Trypanblau* muss die Zeitspanne zwischen Anfärbung und Auszählung möglichst gering sein, da ansonsten falsch negative Ergebnisse beobachtet werden.

Die angefärbten Zellen lassen sich im Mikroskop beurteilen. Zur Bestimmung der Zellzahl werden die vitalen Zellen in allen 4 Großquadraten ausgezählt. Die Anzahl pro ml ergibt sich aus dem Mittelwert dieser Zählung multipliziert mit 10^4 und dem Faktor der Verdünnung mit *Trypanblau* [70, 107].

2.3.3 Kryokonservierung von T-Lymphozyten

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen wurden bis zur endgültigen experimentellen Verwendung kryokonserviert. Die Kryokonservierung bezeichnet das Einfrieren und Lagern von Zellen bei Temperaturen von unter -130°C . Die Zellen wurden in einem mit Flüssigstickstoff gefüllten Tank bei Temperaturen zwischen -196°C und -210°C gelagert.

Mehrere Prozesse spielen beim Herunterkühlen der Zellen eine wichtige Rolle. Zunächst beginnt das Wasser des Extrazellarraumes zu gefrieren. Dadurch steigt die Konzentration der gelösten Stoffe im noch nicht gefrorenen Teil der Extrazellulärflüssigkeit deutlich an. Das entstehende Konzentrationsgefälle kann ausgeglichen werden, in dem intrazellulär noch nicht gefrorenes Wasser in den Extrazellulärraum ausströmt oder durch Gefrieren des Wassers im Zellinneren mit ähnlichem Anstieg der Konzentration gelöster Stoffe. Die Geschwindigkeit des Herunterkühlens, die Kühlrate, ist bestimmt welcher Prozess überwiegt. Bei geringer Kühlrate kommt es zur Dehydrierung der Zelle. Bei einer zu hohen Kühlrate entstehen intrazellulär viele kleine Eiskristalle, während bei niedrigerer Kühlrate weniger, dafür aber größere Eiskristalle gebildet werden. Die kleinen Eiskristalle sind aufgrund eines ungünstigen Größe-Volumen-Verhältnisses thermodynamisch instabil. Beim Auftauen kann es zum initialen Tauen der kleinen Kristalle und folgend zur Rekristallisation kommen. Dieser Prozess führt häufig zum Zelltod. Aus diesem Grund muss die Kühlrate der optimalen Zellprotektion entsprechend angepasst werden. Es wird eine Rate von ca. -1°C pro Minute anvisiert.

Neben der angepassten Kühlrate wird der Zellsuspension ebenfalls Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel zugesetzt. DMSO gehört zur Gruppe der sog. penetrierenden Kryoprotektiva, die aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes (60 - 90 g/Mol) Zellmembranen durchdringen und ihre Wirkung intrazellulär entfalten können. DMSO bewirkt intrazellulär die Bildung von kleineren Kristallen bei niedrigeren Kühlraten und verhindert so mechanische Schäden. Gleichzeitig

kommt es auch zu einer Beeinflussung der Form der Eiskristalle und zu protektiven Effekten in Bezug auf die Rekristallisationsrate beim Auftauen [107, 70].

Zur Durchführung der Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 5ml Einfriermedium resuspendiert. Dieses Einfriermedium bestand aus RPMI-1640 mit 20 % FCS und 10 % DMSO. Nachdem die Zellen resuspendiert worden waren, wurden diese in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen pro ml in Kryokonservierungsröhrchen mit einem Gesamtvolumen von 1ml pro Kryokonservierungsröhrchen gefüllt und diese in mit Isopropanol befüllten Einfrierboxen für 24 - 120 Stunden bei -80°C gelagert. Die Einfrierboxen dienen der Regulation der Kühlrate auf ca. -1°C pro Minute. Danach wurden die Zellen aus den Einfrierboxen in den Stickstofftank überführt.

Zur Verwendung der Zellen wurden diese 24 Stunden vor dem Beginn des Versuchs aufgetaut und 5ml pro $5 \cdot 10^6$ Zellen in RPMI-1640 mit 10 % FCS resuspendiert. DMSO zeigt als organisches Lösungsmittel bei Raumtemperatur zytotoxische Effekte. Aus diesem Grund erfolgte das Auftauen der kryokonservierten Zellen so schnell wie möglich. Die Zellen wurden im vorgeheizten Wasserbad bei 37°C geschwenkt. Sobald sich die gefrorene Zellsuspension aufgelöst hatte, wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen, das mit RPMI-1640 mit 10 % FCS (5ml für $5 \cdot 10^6$ Zellen) befüllt war, überführt. Das vorgelegte Nährmedium war zuvor im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt worden. Die Zellen wurden bei 1500 U/Min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 5ml RPMI-1640 mit 10 % FCS resuspendiert und die Zellzahl wie beschrieben bestimmt (siehe Kap. 2.3.2).

2.4 T-Zell Isolation aus PBMC

2.4.1 Magnetische Zellseparation (MACS)

Für die Durchführung der Experimente wurden definierte T-Zell-Subpopulationen verwendet. Die Separation dieser Populationen erfolgte mittels Magnetic Activated Cell Sorting (MACS). Das Prinzip der MACS-Sortierung beruht auf der immunmagnetischen Separation von T-Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenmarker. Hierfür wird die zu separierende Zellsuspension zusammen mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmoleküle wie bspw. CD4, CD8, CD61 oder TCR γ/δ inkubiert. Ein Teil dieser an Zellen bindenden Primärantikörper ist an sog. Magnetbeads gekoppelt. Bei allen Primärantikörpern, die nicht direkt mit einem



Abb. 5: Magnetische Zellseparation, Apparatur und Funktionsprinzip, (modifiziert nach [5])

Magnetbead gekoppelt sind, werden Sekundärantikörper, die gegen die Primärantikörper gerichtet sind, in einem zweiten Schritt hinzugefügt [77].

Magnetbeads sind sehr kleine paramagnetische Partikel, die von einer Polystyrol-, Polysaccharid- oder Silanhülle umgeben sind. Die paramagnetische Eigenschaft hat zur Folge, dass diese Partikeln in einem starken Magnetfeld zwar magnetisch aktiv sind, aber ohne dieses Magnetfeld nicht miteinander verklumpen [70].

Nachdem die Inkubationsschritte vollzogen wurden, wird die Zellsuspension in eine Säule mit einer ferromagnetischen Matrix (Eisenwolle, oder Eisenkügelchen) gegeben, die sich innerhalb eines starken Magnetfeldes befindet. Alle Zellen, die (zum Teil über Primärantikörper) mit Magnetbeads gekoppelt sind, werden in dieser Säule festgehalten. Alle nicht gekoppelten Zellen können die Matrix ungehindert passieren. Die in der Säule gebundenen Zellen, können nach Inaktivierung des Magnetfeldes aus der Matrix ausgewaschen und für weitere Experimente verwendet werden [70].

Bei der MACS-Separation lassen sich eine positive und eine negative Selektion voneinander unterscheiden. Bei der negativen Selektion werden Antikörper verwendet, die an alle nicht erwünschten Zellen binden. Nach Abschluss der Prozedur liegen die Zielzellen in unveränderter Form vor. Im Gegensatz dazu trägt die Zielzelle bei der positiven Selektion, bei der diese selber mit einem Antikörper gekoppelt wird, am Ende des Vorgangs den Antikörper/Magnetbead-Komplex auf ihrer Oberfläche [77].

2.4.2 Isolation CD4 positiver T-Lymphozyten aus PBMCs

Die CD4 positiven T-Lymphozyten wurden aus durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMCs (siehe 2.3.1) mit dem *CD4+ T Cell Isolation Kit* der Firma *Miltenyi Biotec GmbH* durch negative Selektion separiert.

Zunächst wurde die Zellzahl wie beschrieben mit der Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung mit *Trypanblau* bestimmt (siehe 2.3.2). Daraufhin wurde die Zellsuspension bei 1500 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 40 μl pro 10^7 Zellen MACS-Puffer resuspendiert. Hierzu wurden 10 μl pro 10^7 Zellen des *CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktails* gegeben. Dieser Cocktail enthält monoklonale, Biotin gekoppelte Antikörper gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und CD235a. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei 2 - 8°C wurden 30 μl pro 10^7 Zellen MACS-Puffer hinzugegeben. Darauf wurden 20 μl pro 10^7 Zellen des *CD4+ T Cell MicroBead Cocktail* beigefügt und die Suspension für weitere 10 Minuten bei 2-8°C inkubiert. Der *CD4+ T Cell MicroBead Cocktail* enthält, an monoklonale anti-Biotin Antikörper (Antikörperklasse IgG1, Maus) gekoppelte, magnetische Beads. Weiterhin ist ein Magnetbead gekoppelter Antikörper gegen den auf Thrombozyten exprimierten CD161 (Antikörperklasse IgG1, Maus) enthalten.

Nachdem die Zellsuspension mit MACS-Puffer auf ein Volumen von 500 μl aufgefüllt wurde, wurden die Zellen in ein sich in einem Magnetfeld befindendes *LS Column* gegeben. Nachdem ersten Durchlauf wurde die Säule einmalig mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die durchlaufenden Zellen wurden mit einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach Abschluss des Waschvorganges wurde das Magnetfeld durch Entfernen der Säule aus dem Magneten inaktiviert und die in der Matrix verbliebenen Zellen mit 5 ml MACS-Puffer und dem zur Säule gehörenden Stempel unter erhöhtem Druck ausgespült und aufgefangen.

2.4.3 Isolation naiver (CD45RA+CD27-) T-Lymphozyten aus der Gesamtheit CD4 positiver T-Lymphozyten

Aus der Gruppe der CD4 positiven T-Lymphozyten (siehe 2.4.2) wurden in einem zweiten Schritt naive T-Lymphozyten isoliert. Hierzu wurde das *Naive CD4+ T Cell Isolation Kit II* der Firma *Miltenyi Biotec GmbH* für diese negative Selektion verwendet.

Zunächst wurde wiederum die Zellzahl der isolierten CD4 positiven T-Lymphozyten bestimmt (siehe 2.3.2) und die Zellsuspension bei 1500 U/Min für 10 Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 40 μl pro 10^7 Zellen MACS-Puffer resuspendiert. Folgend wurden 10 μl pro 10^7 Zellen des *Naive CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II* hinzugefügt. In diesem Cocktail sind monoklonale, Biotin gekoppelte Antikörper gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD45RO, CD56, CD123, TCR γ/δ , HLA-DR und CD235a enthalten. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 2 - 8°C wurden die Zellen mit 2 ml pro 10^7 Zellen MACS-Puffer gewaschen und bei 1500 U/Min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Zellpellet mit 80 μl pro 10^7 Zellen MACS-Puffer resuspendiert. Es wurden hierzu 20 μl pro 10^7 Zellen der *Anti-Biotin MicroBeads* hinzugegeben. Diese magnetischen Beads sind an monoklonale anti-Biotin Maus-Antikörper der Klasse IgG1 gekoppelt. Die Zellsuspension wurde zusammen mit den Beads für 15 Minuten bei 2 - 8°C inkubiert und danach durch Zugabe von 2 ml pro 10^7 Zellen MACS-Puffer gewaschen.

Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 500 μl MACS-Puffer resuspendiert und die Zellen auf ein im Magnetfeld befindliches *LS Column* gegeben. Die Säule wurde 3 Mal durch vorsichtige Zugabe von jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen und die durchlaufende Zellfraktion aufgesammelt. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt und die in der Matrix verbliebenen Zellen mit 5 ml MACS-Puffer und dem zur Säule gehörenden Stempel unter erhöhtem Druck ausgespült und aufgefangen [77].

2.4.4 Isolierung von CD25+ T-Lymphozyten mit MACS-Beads

Für die Untersuchung der Funktionalität induzierbarer regulatorischer T-Lymphozyten wurden, nach Induktion aus naiven T-Lymphozyten, CD25 positive T-Lymphozyten mit dem *CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit* der Firma *Miltenyi Biotec GmbH* separiert. Die Separation der CD25 positiven Zellen erfolgte durch eine positive magnetische Zellseparation.

Hierfür wurden die Zellen nach Ablauf der Induktion aus der Kulturplatte in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit frischem Nährmedium gewaschen. Die Zellsuspension wurde folgend bei 1500 U/Min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit 90 μl pro 10^7 Zellen MACS-Puffer resuspendiert und es wurden 10 μl pro 10^7 Zellen der (humanen) *CD25 MicroBeads* hinzugefügt. Die *CD25 MicroBeads* sind magnetische Beads, die an einen monoklonalen CD25 Antikörper (IgG1, Maus) gekoppelt sind. Diese Suspension wurde

für 15 Minuten bei 2 - 8°C inkubiert und danach mit 2 ml pro 10^7 Zellen MACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet mit 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert.

Die resuspendierten Zellen wurden in ein *MS Column* gegeben und 3 Mal mit jeweils 500 μ l MACS-Puffer ohne erhöhten Druck gewaschen. Das Magnetfeld wurde dann durch Entfernen der magnetischen Säule inaktiviert. Durch Zugabe von 1 ml MACS-Puffer wurden mit Hilfe des zugehörigen Stempels die an Magnetbeads gekoppelten CD25 positiven Zellen aus der paramagnetischen Matrix herausgespült und aufgefangen [77].

2.5 Allgemeine Kulturbedingungen

Um zu untersuchen, ob es quantitative oder qualitative Unterschiede in der Reaktion auf eine Stimulation des Immunsystems zwischen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und gesunden Menschen gibt, wurden T-Lymphozyten unter verschiedenen Bedingungen kultiviert.

Alle Experimente wurden unter einer sterilen Arbeitsbank mit laminärer Luftströmung nach intensiver Reinigung der Oberflächen und aller Laborinstrumente und Materialien mit 70 % Alkohollösung durchgeführt. Die verschiedenen Zellreihen wurden in einem Inkubationsbrutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für die Inkubation wurden die Zellen in 12-, 24- oder 96-Loch-Platten gelagert. Es wurden nur 96-Loch-Platten mit rundem Boden verwendet.

2.6 Zellkultur von naiven T-Lymphozyten

2.6.1 Versuchsansatz und Kulturbedingungen

Für die Untersuchung der quantitativen Reaktion naiver T-Lymphozyten auf einen immunologischen Reiz wurden naive T-Lymphozyten nach Isolierung aus PBMCs (siehe 2.4.3) unter verschiedenen Bedingungen für 96 Stunden kultiviert.

Eine Stimulation eines Teils der naiven T-Lymphozyten wurde zum einen unspezifisch durch Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD3 ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich, OKT3, monoklonaler IgG2a Antikörper) und CD28 ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich, CD28.2, monoklonaler IgG1 Antikörper) durchgeführt.

Zum anderen wurde ein Teil der naiven T-Lymphozyten spezifisch mit einem Antigenpool von *C. albicans* (*PepTivator Candida albicans MP65 - research gra-*

	Zytokine	Konzentration
TH17/1	IL1 β	100 ng/ml
	IL6	30 ng/ml
	IL23	100 ng/ml
TH17/1 + anti-IFN γ	IL1 β	100 ng/ml
	IL6	30 ng/ml
	IL23	100 ng/ml
	antiIFN γ	10 μ g/ml
TH17/1 + TGF β	IL1 β	100 ng/ml
	IL6	30 ng/ml
	IL23	100 ng/ml
	TGF β	5 ng/ml

Tab. 11: Die Tabelle zeigt die in der proinflammatorischen Zellkultur verwendeten Zytokine und deren Konzentrationen

de der Firma *Miltenyi Biotec GmbH*) stimuliert. Dieser Antigenpool besteht aus lyophilisierten Peptiden des in der Zellwand von *C. albicans* vorkommenden Mannoproteins MP65 (Molekularmasse: 65 kD). MP65 wird als Major-Aktivator der T-Zell Immunologie gegen *C. albicans* angesehen. Für die Stimulation wurde entsprechend der Herstellerempfehlung eine Konzentration von $c = 0,6\text{nmol/ml}$ pro Peptid verwendet [29].

Weiterhin wurde die Stimulation der naiven T-Lymphozyten in Anwesenheit eines bestimmten Zytokinmilieus durchgeführt. Um die Reaktion und Differenzierung der naiven T-Lymphozyten im Sinne einer TH17-Antwort zu simulieren wurden die Zytokine IL1 β , IL6 und IL23 hinzugefügt. In weiteren Versuchsreihen wurde der Einfluss bei Zugabe von TGF β und bei Blockade von IFN γ untersucht (siehe Tab. 11).

Für die Simulation einer regulatorischen T-Zell-Antwort wurden die naiven T-Lymphozyten in Anwesenheit der Zytokine TGF β und IL2 stimuliert (siehe Tab. 12).

Die naiven T-Lymphozyten wurden zusammen mit dem entsprechenden Stimulus, der Zytokinkombination, sog. Feederzellen (siehe Kap. 2.6.2) und dem Nährmedium in einer 96-Loch-Platte mit rundem Boden bei einem Gesamtvolumen von 200 μ l pro Loch inkubiert. Pro Loch wurden 250.000 naive T-Lymphozyten und 50.000 Feederzellen kultiviert.

Als Nährmedium wurde *X-Vivo-15* der Firma *Lonza* verwendet. X-Vivo-15 ist ein serumfreies Medium. Als Zusätze sind L-Glutamin, Gentamicin und Phenol-Rot enthalten. Die Zellen wurden für insgesamt 96 Stunden bei definierten Bedin-

	Zytokine	Konzentration
Treg1	TGF β	10 ng/ml
	IL2	125 ng/ml
Treg1 + anti-IFN γ	TGF β	10 ng/ml
	IL2	125 ng/ml
	antiIFN γ	10 μ g/ml

Tab. 12: Die Tabelle zeigt die in der antiinflammatorischen Zellkultur verwendeten Zytokine und deren Konzentrationen

gungen (siehe 2.5) kultiviert.

Die Stimulationsdauer wurde in Vorversuchen anhand der Zytokinproduktion und der Zellvitalität etabliert. Die Zusammensetzung der Zytokinansätze und die zu verwendenden Konzentrationen wurden ebenfalls in vorab durchgeführten Testungen eruiert.

2.6.2 Generierung von Feederzellen

Neben der Interaktion eines Antigens mit dem T-Zell-Rezeptor, der Aktivierung costimulatorischer Moleküle und der Anwesenheit eines bestimmten Zytokinmilieus spielt die Interaktion verschiedener Zellen mit den T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei deren Proliferation. Diese direkten Zell-Zell-Kontakte, wie sie bspw. zwischen Dendritischen Zellen und T-Lymphozyten bei der Antigenpräsentation entstehen, sollen durch die Anwesenheit sog. Feederzellen simuliert werden.

Zur Gewinnung autologer Feederzellen wurde die CD4 depletierte Zellfraktion der PBMCs nach MACS-Isolation verwendet (siehe 2.4.2). Da Feederzellen zwar die Proliferation der Zielzellen unterstützen, aber gleichzeitig keine eigene Zellteilung durchführen sollten, wurden diese inaktiviert. Diese Inaktivierung wurde durch eine Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen bei einer Gesamtenergiedosis von 30 Gray in einer Strahlenkammer der Forschungsabteilung der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Würzburg umgesetzt.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Feederzellen in der Lage waren die Proliferationsaktivität der CD4 positiven naiven T-Lymphozyten zu verstärken. Durch die Bestrahlung und Inaktivierung kommt es bei den Feederzellen innerhalb weniger Tage zum Zelltod. Es konnte gezeigt werden, dass nach 96 Stunden keine Feederzellen mehr in der Zellkultur detektierbar waren.

Zytokine	Konzentration
TGF β	10 ng/ml
IL2	125 ng/ml

Tab. 13: Zytokinmilieu für die Differenzierung in regulatorische T-Lymphozyten

2.7 Untersuchung der Suppressionsfähigkeit von CD25 positiven Tregs

2.7.1 Versuchsansatz und Kulturbedingungen

Aus peripheren mononukleären Zellen wurden wie beschrieben (siehe Kap. 2.4.3) naive T-Lymphozyten in 2 Isolationsschritten durch magnetische Selektion separiert. Diese naiven T-Lymphozyten wurden für mehrere Tage in einer Umgebung kultiviert, die die Differenzierung in regulatorische T-Lymphozyten fördert (siehe Kap. 2.7.2). Nach Abschluss der Induktionsphase wurden die hierbei entstandenen CD25 positiven regulatorischen T-Lymphozyten durch magnetische Separation (siehe Kap. 2.4.4) selektiert. Diese hoch angereicherte Population CD25 positiver T-Lymphozyten wurde anschließend mit autologen CD4 positiven T-Lymphozyten, die im Rahmen der magnetischen Isolation der naiven T-Lymphozyten übrig geblieben sind und zur Proliferationsdiagnostik mit CFSE angefärbt wurden, in Co-Kultur gebracht (siehe Kap. 2.7.4). Die Proliferationsfähigkeit der autologen CD4 positiven Zellen wurde im Durchflusszytometer gemessen und darüber wurden Rückschlüsse auf die Suppressionsfähigkeit der induzierten regulatorischen T-Lymphozyten gezogen (siehe Kap. 2.8.4).

2.7.2 Generierung von CD25+ Tregs in der Zellkultur

Um CD25 positive T-Lymphozyten zu generieren wurden naive T-Lymphozyten (nach der Isolation aus der Gruppe der peripheren mononukleären Zellen (siehe Kap. 2.4.2 und 2.4.3) in Anwesenheit eines die Differenzierung in regulatorische T-Lymphozyten fördernden Zytokinmilieus (siehe Tab. 13) kultiviert. Zur Verstärkung der Proliferation und Differenzierung wurden Feederzellen im Verhältnis 1:5 hinzugegeben. Die Zellen wurden für 120 Stunden in einer 12-Loch-Platte bei einem Gesamtvolumen von 2 ml in einem Brutschrank bei 37°C und einer 5% CO²-Atmosphäre inkubiert.

Nach Ablauf der Kultivierung wurden die CD25 positiven Zellen, wie bereits beschrieben (siehe Kap. 2.4.4), isoliert und konnten für die weitere Versuchsdurch-

führung verwendet werden.

2.7.3 CFSE Färbung von vitalen T-Lymphozyten

Um die Proliferative Aktivität der Effektor-T-Lymphozyten unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von CD25 positiven regulatorischen T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden diese mit Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester (CFDA-SE) gefärbt. Dieses zunächst nicht fluoreszierende Molekül ist in der Lage die Zellwand zu durchdringen und so in die Zelle zu diffundieren. Im Zellinneren spalten Esterasen die beiden Acetat Reste vom CFDA-SE ab und es entsteht Carboxyfluoreszein-Succinimidylester (CFSE). Dieses CFSE ist ein fluoreszierendes Molekül (Absorptionsmaximum 492 nm, Emissionsmaximum 517 nm) und kann im Durchflusszytometer detektiert werden [70].

Die Succinimidyl-Gruppe des CFSE reagiert im Zellinneren mit freien Aminen. Dadurch kommt es zu stabilen Bindungen an zytoplasmatischen Strukturen, so dass auch nach mehrtägiger Zellkultur kein CFSE-übertritt auf andere Zellen beobachtet wird. Bei der Zellteilung wird dieses fluoreszierende Molekül zu gleichen Teilen auf Mutter- und Tochter-Zelle aufgeteilt, so dass die Intensität der Fluoreszenz mit Zunahme der Zellteilungen abnimmt. Auf diese Art ist es möglich, proliferierende Zellen von nicht proliferierenden Zellen zu unterscheiden [70].

Zur Durchführung der Färbung wurden die Zellen bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 ml einer PBS-Lösung mit 5 % FCS resuspendiert. Hierzu wurde eine CFDA-SE-Lösung im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und mit den Zellen für 5 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit Nährmedium gewaschen und bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Nährmedium resuspendiert.

2.7.4 Co-Kultivierung von CD25+ Tregs und CFSE markierten Effektor-T-Lymphozyten

Nach Generierung und Isolation der CD25 positiven T-Lymphozyten (siehe Kap. 2.7.2) und Färbung der Effektor-T-Lymphozyten (siehe Kap. 2.7.3) wurden beide Zellgruppen in den Verhältnissen 1:1 und 0,5:1 für 120 Stunden miteinander inkubiert.

Um eine Proliferation der Effektor-Lymphozyten zu bewirken wurden als unspezifischer Stimulus Antikörper gegen CD3 ($c=1 \mu\text{g/ml}$) und gegen CD28 ($c=1$

$\mu\text{g/ml}$) verwendet. Zur Unterstützung der proliferativen Aktivität der Effektor-Zellen wurden Feederzellen im Verhältnis 1:5 hinzugegeben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die CFSE-bedingte Fluoreszenzaktivität der Effektor-Zellen als Marker der Zellproliferation im Durchflusszytometer gemessen.

2.8 Durchflusszytometrie - FACS

2.8.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)) ist ein Verfahren, mit dem Zellen quantitativ und qualitativ anhand ihrer Größe, Granularität und bestimmter Oberflächenmoleküle näher charakterisiert werden können. Die Methode basiert auf der Detektion unterschiedlicher Lichtstreuungseigenschaften von Zellen in Folge einer Bestrahlung mit einem Laser und ist in der Lage innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl an Zellen zu charakterisieren.

In einem Durchflusszytometer werden Zellen in einem laminaren Strom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Von diesem Laser wird monochromatisches Licht (Licht einer bestimmten Wellenlänge) ausgesandt, das nach Bündelung durch eine Fokussierungslinse auf die Zelle in der Messküvette trifft. Dieses auf die sich im laminaren Strom befindliche Zelle auftreffende Licht wird nun beim Auftreffen in der Messküvette gestreut. Das gestreute Licht wird über ein komplexes optisches System mit mehreren Spiegeln, Linsen und Lichtfiltern weiterverarbeitet und über mehrere Licht-Detektoren in ein digitales Signal umgewandelt (siehe Abb. 6).

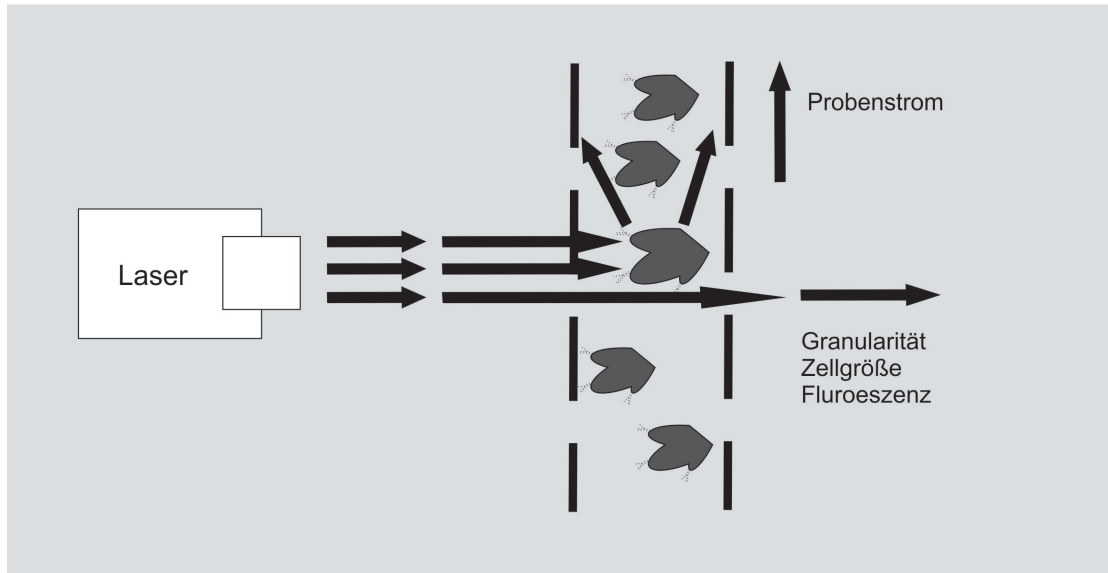


Abb. 6: Prinzip der FACS-Messung(modifiziert nach [6])

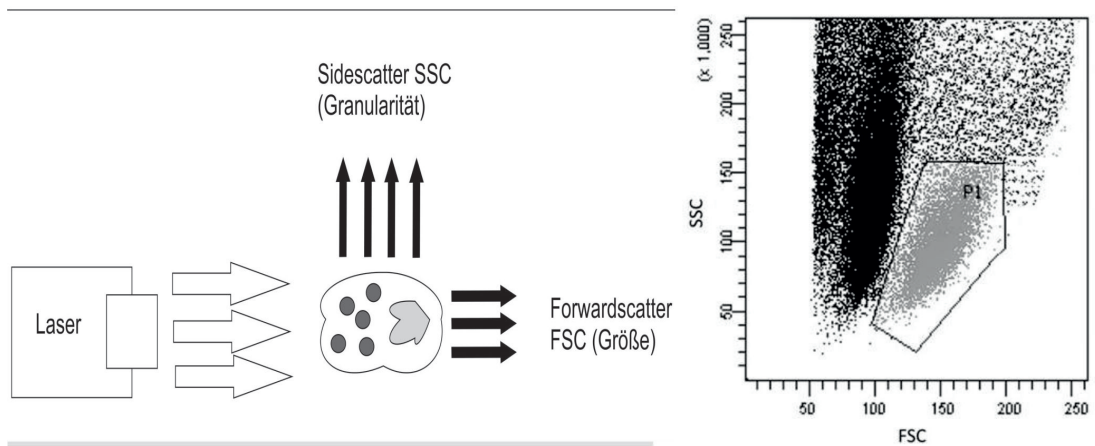


Abb. 7: FSC- und SSC-Messung, Prinzip und Beispiel einer Dot-Plot Darstellung (modifiziert nach [7])

Zunächst wird das in Verlängerung der vom Laser ausgesandten Lichtstrahlung gestreute sog. Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter (FSC)) detektiert und damit die Zellgröße bestimmt. Das in einem Winkel von 90 Grad von der Zelle reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (Sidescatter (SSC)) bezeichnet. Dieses nach Brechung des Lichtes auf der Zelle reflektierte Licht ist abhängig von der Zellbeschaffenheit und stellt ein Maß für die Zellgranularität dar. Die Zusammenschau von Forwardscatter und Sidescatter ermöglicht die Zuordnung der gemessenen Zellen zu bestimmten Zellpopulationen (siehe Abb. 7).

Neben der Detektion von Forwardscatter und Sidescatter können Fluoreszenzfarbstoffe z.B. über Antikörper an Zellbestandteile gekoppelt werden. Diese Fluorochrome absorbieren das monochromatische Licht des Lasers. Hierdurch angeregte Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei der Rückkehr auf ihr Ursprungsniveau emittieren diese Elektronen Energie in Form von Photonen. Dieses Fluoreszenzlicht befindet sich in einem höheren Wellenlängenbereich als das vom Laser emittierte Licht. Es wird über das optische System zu verschiedenen Detektoren geleitet und in digitale Signale umgesetzt. Abhängig von der Anzahl der Laser und der Komplexität des optischen Systems, ist es möglich eine Vielzahl an Parametern einer Zelle in einem Messvorgang zu bestimmen.

Für diese Arbeit wurde ein *FACS CANTO II* der Firma *BD Biosciences* verwendet. Dieses Durchflusszytometer ist mit drei Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht in den Wellenlängenbereichen 488 nm, 633 nm und 405 nm emittieren. Für die Detektion der von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Photonen stehen 8-Photonendetektoren zu Verfügung.

Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit der *FACSDiva*-Software der Firma *BD Biosciences*.

2.8.2 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Für die Färbung der Oberflächenmoleküle wurden die in Tabelle 14 angegebenen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellen aus den 96-Loch-Platten in *FACS-Tubes* überführt und mit 1 ml *FACS-Puffer* gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1500 U/Min wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 50 μ l einer Kombination aus Fluoreszenzfarbstoffen und *FACS-Puffer* resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit 1 ml *PBS* gewaschen und bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit *FACS-Puffer*

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD25	FITC
CD127	BV 421
CD27	PE/Cy7
CD45RO	PerCP/Cy5.5
CD62L	APC/Cy7
IFN γ -R	PE

Tab. 14: Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper für die Oberflächenfärbung

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
FOXP3	PerCP/Cy5.5
IL10	APC
IL17	Alexa Flour 700
IL17	BV 421
Ki67	APC
IFN γ	FITC

Tab. 15: Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper für die Färbung intrazellulärer Moleküle

für die Messung im Durchflusszytometer resuspendiert. Bis zur Durchführung der Messung wurden die Zellen bei 4°C gelagert.

2.8.3 Färbung von intrazellulären Zellmarkern

Für die weitere Charakterisierung der Zellen wurden neben der Bestimmung von Oberflächenmarkern auch intrazelluläre Moleküle angefärbt. Hierfür wurde das Färbeprotokoll für intrazelluläre Moleküle an das Protokoll der Oberflächenfärbung angeschlossen.

Die für die intrazelluläre Färbung verwendeten Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Als Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit in der Bestimmung der intrazellulären Moleküle wurde die Zytokinproduktion nach Ablauf der Inkubationszeit bei gleichzeitiger Blockade der Proteinsekretion erneut angeregt. Hierfür wurden die Zellen für 3 Stunden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert.

PMA ist ein Phorbolster, der als Strukturanalogon von Diacylglycerin in der Lage ist über die Aktivierung der Proteinkinase C verschiedene Signalkaskaden in T-Lymphozyten zu aktivieren [113].

Ionomycin ist ein Ionophore, das eine Freisetzung von Calcium bewirkt und darüber Calcium/Calmodulin abhängige Signalkaskaden aktivieren kann. Im Zusammenspiel bewirken PMA und Ionomycin eine starke Aktivierung der T-Lymphozyten [22].

Die Blockade der Proteinsekretion wurde durch Zugabe von Brefeldin A (BFA) bewirkt. BFA ist ein Pilzmetabolit und gehört zu den Lacton-Antibiotika. Es entfaltet seine sekretionsinhibierende Wirkung durch Interaktion mit dem Golgi-Apparat. Die Folge ist eine Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum [112].

Zur Durchführung der intrazellulären Färbung wurden die Zellen zunächst einmal, um die Färbung der Oberflächenmoleküle zu stabilisieren, mittels *Cytofix* fixiert. Hierzu wurden die Zellen mit 250 μl *Cytofix* für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml *Permeabilisierungs-Puffer* gewaschen und bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 50 μl einer Kombination aus Fluoreszenzfarbstoffen und *Permeabilisierungs-Puffer* resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Der *Permeabilisierungs-Puffer* diente zur Lyse der Zellmembranen, um eine Inkorporation der an Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zu gewährleisten.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit 1 ml *Permeabilisierungs-Puffer* gewaschen und bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit *FACS-Puffer* für die Messung im Durchflusszytometer resuspendiert. Bis zur Durchführung der Messung wurden die Zellen bei 4°C gelagert.

2.8.4 CFSE Detektion zur Proliferationsdiagnostik

Zur Untersuchung der Suppressionsfähigkeit von regulatorischen T-Lymphozyten im in vitro Modell (siehe Kap. 2.7.3) wurden mit CFSE markierte Effektor-Zellen mit Tregs in Co-Kultur gebracht.

CFSE ist ein fluoreszierendes Molekül, dessen Signal mit dem Durchflusszytometer bestimmt wurde. CFSE absorbiert Licht bei einem Maximum von 492 nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 517 nm. Die Intensität des Fluoreszenzsignals entspricht hierbei der Teilungsaktivität der Effektor-T-Lymphozyten. Das Maximum der Signalintensität liegt bei T-Lymphozyten vor, bei denen keine Zellteilung stattfand (siehe Abb. 8).

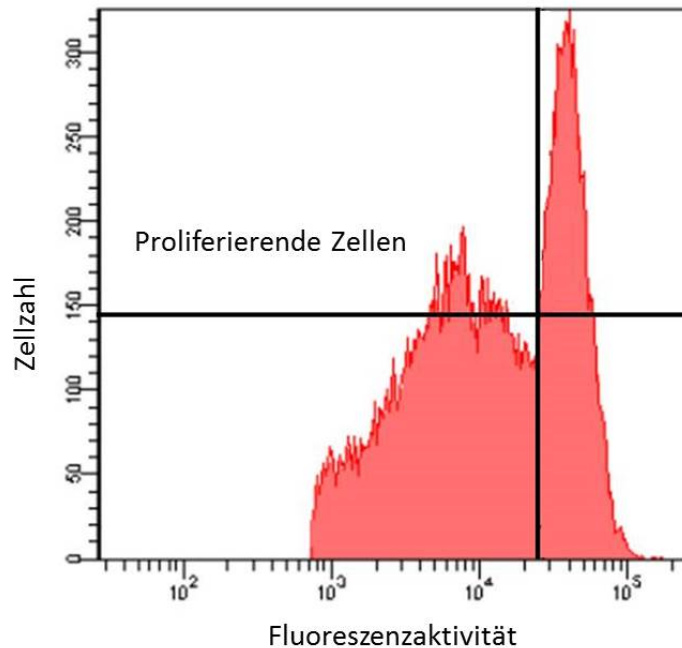


Abb. 8: FACS Messung CFSE gefärbter Zellen nach Zellkultur

2.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der Analyse-Software *IBM SPSS Statistics* der Firma IBM (Armonk, New York, USA) in der Version 23 durchgeführt.

Bei Vorhandensein häufig nicht-parametrisch verteilter Daten (Testung nach Shapiro-Wilk) und kleiner Fallzahlen im Rahmen dieses explorativen Studiencharakters wurde bei nicht-verbundenen Daten der Mann-Whitney-U-Test zur Überprüfung signifikanter Unterschiede durchgeführt. Für verbundene Variablen wurde der Wilcoxon-Rank-Test verwendet.

Zur Neutralisierung einer Alphafehler-Kumulierung durch Multiples Testen bei Untersuchung der Patientengruppen der Kinder wurde die Korrektur nach Benjamini-Hochberg durchgeführt. Die Toleranz für falsch-signifikante Resultate wurde bei $q = 0,1$ festgelegt.

Zur Überprüfung auf mögliche Unterschiede wurde das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Bei einem p-Wert von $0,1 \geq p \geq 0,05$ wurde von einem Trend in Richtung eines Unterschiedes gesprochen.

Eine Berechnung möglicher Korrelationen wurde auf Grund der niedrigen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen nicht durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Reinheit der CD4+ und CD4+CD45RA+CD27- T-Zellfraktionen nach MACS-Isolation

3.1.1.1 Ergebnisse zu untersuchten Proben von Kindern

Die magnetische Isolierung der naiven T-Lymphozyten wurde in 2 Teilschritten durchgeführt. Zunächst wurden aus den peripheren mononukleären Zellen die CD4 positiven T-Lymphozyten selektiert (siehe Kap. 2.4.2). Bei den Kindern zeigte sich hierbei, bei einer Fallzahl von insgesamt n=15, für die Reinheit der Isolation der CD4 positiven T-Lymphozyten ein Mittelwert von 96,21 % mit einer Standardabweichung von 2,53% (siehe Tab.16).

Nach dem zweiten Isolationsschritt zur Selektion der naiven T-Lymphozyten zeigte sich ein Mittelwert für die Reinheit der naiven T-Lymphozyten von 95,14 % bei einer Standardabweichung von 3,71 % (siehe Tab.16). In der Abbildung 9 ist beispielhaft die Darstellung der Zellfraktionen in der FACS-Messung gezeigt.

	Anzahl n=	Mittelwert \pm SD in %	Median	Min-Max in %
CD4+	15	96,21 \pm 2,53	97,38	91,11 - 98,61
CD45RA+CD27+	15	95,14 \pm 3,71	95,35	87,22 - 99,74

Tab. 16: Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen nach Isolation

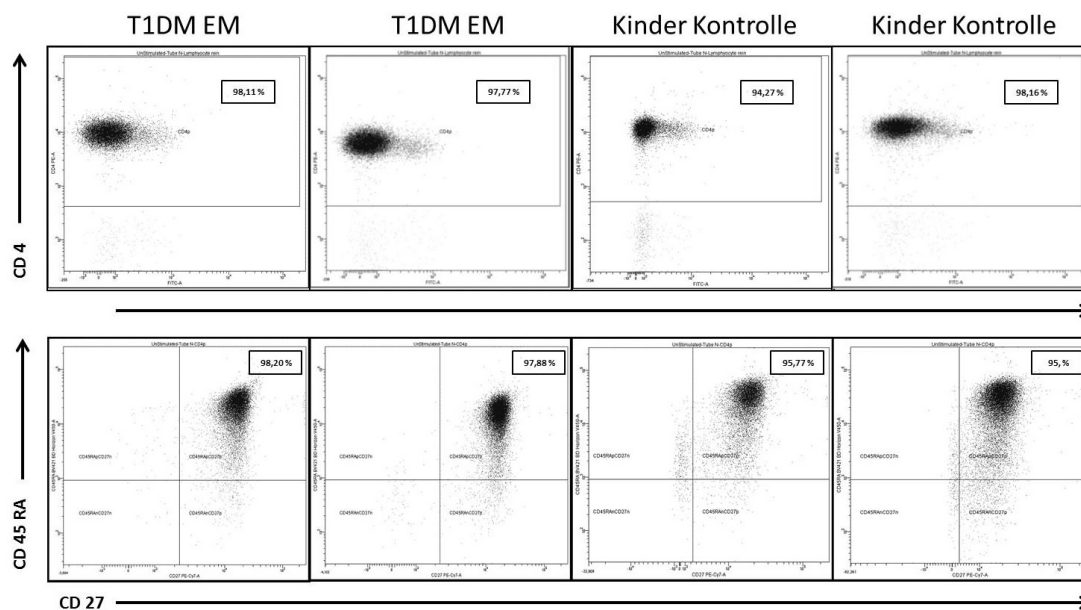


Abb. 9: Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen nach Isolation, Darstellung der FACS-Messung anhand von zwei Beispielen der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und der Kontrollpatienten

3.1.1.2 Ergebnisse zu untersuchten Proben von Erwachsenen

Bei den Erwachsenen zeigte sich für die Reinheit der Isolierung bei einer Fallzahl von n=10 Probanden ein Mittelwert von 98,09 % bei einer Standardabweichung von 1,3 % (siehe 17).

Nach der Isolierung der naiven T-Lymphozyten aus den CD4 positiven T-Lymphozyten in einem zweiten Teilschritt zeigte sich ein Anteil an CD45RA+CD27+ T-Lymphozyten an den CD4+ T-Lymphozyten von 93,67 % im Mittel. Die Standardabweichung lag bei 6,34 % (siehe Tabelle 17).

	Anzahl n=	Mittelwert ± SD in %	Median	Min-Max in %
CD4+	10	98,09 ± 1,30	98,71	95,71 - 99,31
CD45RA+CD27+	10	93,67 ± 6,34	96,35	84,63 - 99,89

Tab. 17: Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen nach MACS-Isolierung

3.1.2 Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mit den Kontrollpatienten

Verteilung der T-Zell Subpopulationen nach in vitro Stimulation

Im Vergleich der Kinder mit Erstmanifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) und Kontrollpatienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der naiven (CD45RO-CD27+), Memory-(CD45RO+CD27+), Effektor (CD45RO+CD27-) oder terminal differenzierten T-Lymphozyten (CD45RO-CD27-).

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Bei der Untersuchung der proliferativen Aktivität anhand der Expression von Ki67 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kindern mit Diabetes und den Kontrollen.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion in Folge der Zellkultur

Zwischen den an Diabetes erkrankten Kindern und den Kontrollpatienten zeigten sich keine Unterschiede in der Gesamtproduktion von IL17 und IFN γ durch die T-Lymphozyten, genauso wie bei der Betrachtung der IL17+/IFN γ doppelt positiven Zellen insgesamt, innerhalb der Ki67+ Zellen und der IL17-Produktion innerhalb der Ki67+ Zellen.

Die Untersuchung der IFN γ -Produktion innerhalb der Ki67+ Zellen erbrachte einen Trend zu höheren Prozentwerten bei den Kindern mit einer Erstmanifestation des Diabetes (siehe Abb. 10).

Die Untersuchung der IL17-Produktion innerhalb der T-Zell Subpopulationen und die Untersuchung der Expression des IFN γ -Rezeptors erbrachten keine signifikanten Unterschiede.

Verhalten der T-Zell Regulierung nach Kultivierung

Bei der Betrachtung der regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich bei den CD25+FOXP3+ und in der Untergruppe der CD127 negativen CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Betrachtung der Zytokinproduktion der regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich für IL10 und IL17 sowohl innerhalb der CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten als auch innerhalb der CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede.

Die Untersuchung der proliferativen Aktivität der regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte ebenso wie die Expression von CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede

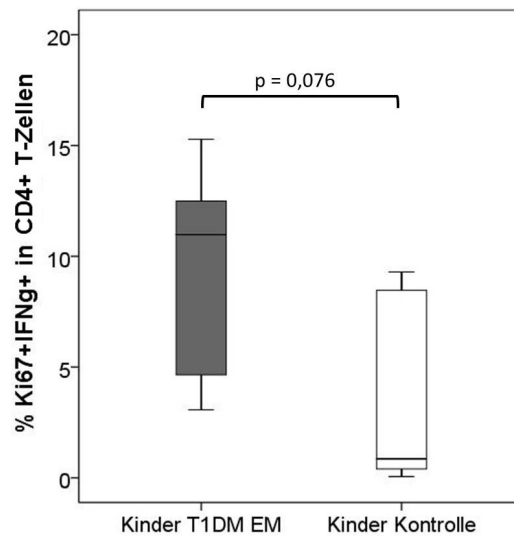


Abb. 10: Anteil der Ki67+IFN γ + T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und den Kontrollpatienten

3.1.3 Untersuchung der Polarisierbarkeit unter spezifischer Stimulation

3.1.3.1 Stimulusabhängige Unterschiede des T-Zell-Verhaltens bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes und den Kontrollpatienten

Um den Einfluss der Stimulation mit aCD3/aCD28 oder dem *C. albicans*-Antigen zu beurteilen, wurden die jeweiligen Stimuli innerhalb der Gruppen miteinander verglichen. Die Verteilung der Daten ist in den Tabellen 18 und 19 dargestellt.

Verteilung der T-Zell Subpopulationen

Diabetiker EM

Es zeigten sich in der Gruppe der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus für die Verteilung der naiven T-Lymphozyten signifikant höhere Werte unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen.

Bei den Memory-T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Verteilung der Effektor-T-Lymphozyten und der terminal differenzierten T-Lymphozyten wies in der Gruppe der Kinder mit einer Erstmanifestation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimuli unter proinflammatorischen Bedingungen auf.

Kontrollen

Es zeigte sich in der Gruppe der Kontrollpatienten für die Verteilung naiver T-Lymphozyten ein Trend zu höheren Prozentwerten unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen.

Bei den Memory-T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28 und für die Effektor und die terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Diabetiker EM

Die Beurteilung der proliferativen Aktivität mittels Untersuchung der Expression von Ki67 erbrachte keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen oder aCD3/aCD28.

Kontrollen

In der Gruppe der Kontrollpatienten zeigten sich signifikant höhere Ki67-Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28 keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen oder aCD3/aCD28.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion

Diabetiker EM

Die Untersuchung der IL17-Produktion und die Begutachtung der für IL17 und IFN γ doppelt positiven T-Lymphozyten insgesamt und innerhalb der Ki67+ Zellen erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Die Betrachtung der IFN γ -Produktion erbrachte einen Trend zu höheren Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28, bei Untersuchung der IFN γ Produktion durch die Ki67 positiven T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Untersuchung der IL17-Produktion innerhalb der naiven und der Effektor-T-Lymphozyten erbrachte signifikant höhere Prozentwerte, für die IL17-Produktion innerhalb der terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Werten durch Stimulation mit *C. albicans*.

Innerhalb der Memory T-Lymphozyten zeigte sich für die Produktion von IL17 kein signifikanter Unterschied zwischen den Stimuli.

Die Untersuchung der Expression des IFN γ -Rezeptors erbrachte signifikant höhere Prozentwerte unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Kontrollen

Bei den Kontrollpatienten zeigte sich bei der Untersuchung der IFN γ - und IL17-Produktion ebenso wie bei den für IL17 und IFN γ doppelt positiven Zellen kein

signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen oder aCD3/aCD28.

Bei der Betrachtung der IL17-Produktion sowie der für IL17 und IFN γ doppelt positiven Zellen innerhalb der Ki67+ Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Für die IFN γ -Produktion zeigte sich innerhalb der Ki67+ Zellen ein Trend zu höheren Werten bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der IL17-Produktion innerhalb der naiven T-Lymphozyten zeigte signifikant höhere Werte unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen.

Innerhalb der Memory-, Effektor- und terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigte sich für die Produktion von IL17 ebenso wie für die Expression des IFN γ -Rezeptors kein signifikanter Unterschied zwischen den Stimuli.

Verhalten der T-Zell Regulation

Diabetiker EM

Die Untersuchung der quantitativen Verteilung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten bei den Kindern mit einer Erstmanifestation erbrachte signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei Betrachtung der IL10-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimuli.

Die Untersuchung der IL17-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigte einen Trend zu höheren Werten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der Zytokinproduktion innerhalb der Untergruppe der CD127 negativen CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigte für die Produktion von IL10 und IL17 signifikant höhere Werte unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 zeigte ebenso wie die Expression von CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Kontrollen

Die Untersuchung der quantitativen Verteilung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigte auch bei den Kontrollpatienten unter proinflammatorischen Bedingungen signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei Betrachtung der IL10- und IL17-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwi-

schen den Stimuli.

In der Untergruppe der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten zeigte sich für die Produktion von IL10 ein Trend zu höheren Werten und für die IL17-Produktion signifikant höhere Prozentwerte unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 und von CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigte signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	3,71 \pm 2,10	4,18	1,10 - 5,78	6,49 \pm 2,44	5,82	3,59 - 9,40	0,138
IFN γ	12,85 \pm 5,28	15,58	7,05 - 17,82	4,80 \pm 2,00	4,67	2,91 - 7,68	0,080
IL17+IFN γ +	1,46 \pm 0,80	1,19	0,48 - 2,46	2,07 \pm 0,49	2,21	1,22 - 2,41	0,225
Ki67+	30,54 \pm 17,42	38,91	8,41 - 49,13	5,00 \pm 5,87	2,91	1,54 - 15,45	0,043
Ki67+IFN γ +	9,29 \pm 5,22	10,98	3,07 - 15,28	0,90 \pm 0,36	0,71	0,54 - 1,40	0,043
Ki67+IL17+	2,12 \pm 1,68	1,93	0,39 - 3,90	1,23 \pm 0,67	1,30	0,50 - 1,94	0,345
Ki67+IL17+IFN γ +	1,16 \pm 0,73	0,90	0,41 - 2,20	0,75 \pm 0,40	0,49	0,45 - 1,32	0,225
CD45RO-CD27+	61,94 \pm 15,20	58,37	42,20 - 82,08	84,08 \pm 7,18	85,56	75,35 - 91,99	0,043
CD45RO-CD27+IL17+	1,10 \pm 0,72	1,19	0,15 - 1,99	3,68 \pm 2,40	2,82	0,68 - 6,39	0,043
CD45RO+CD27+	30,46 \pm 14,58	33,06	11,28 - 49,51	8,16 \pm 3,73	8,01	4,64 - 13,83	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	2,00 \pm 1,34	2,34	0,55 - 3,31	1,55 \pm 0,58	1,47	0,95 - 2,49	0,686
CD45RO+CD27-	4,71 \pm 1,08	5,17	3,52 - 5,95	4,99 \pm 3,18	4,01	1,88 - 10,17	0,896
CD45RO+CD27-IL17+	0,66 \pm 0,28	0,68	0,34 - 1,08	1,02 \pm 0,27	0,92	0,81 - 1,45	0,043
CD45RO-CD27-	2,89 \pm 1,13	2,62	1,93 - 4,77	2,78 \pm 1,48	2,57	1,12 - 5,19	0,686
CD45RO-CD27-IL17+	0,23 \pm 0,06	0,20	0,18 - 0,32	0,47 \pm 0,26	0,49	0,18 - 0,73	0,080
CD25+FOXP3+	42,87 \pm 11,01	47,54	27,63 - 53,72	9,31 \pm 2,48	8,75	6,93 - 12,10	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	32,85 \pm 9,82	37,26	21,69 - 41,47	4,00 \pm 0,90	3,79	2,78 - 4,91	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,66 \pm 1,09	0,21	0,03 - 2,60	0,03 \pm 0,04	0,02	0,00 - 0,10	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,78 \pm 1,15	2,00	0,49 - 3,39	0,19 \pm 0,14	0,13	0,06 - 0,36	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	1,47 \pm 2,31	0,54	0,19 - 5,57	0,83 \pm 0,52	0,98	0,26 - 1,32	0,893
CD25+FOXP3+IL17+	2,44 \pm 2,16	2,03	0,62 - 6,07	3,36 \pm 4,69	1,39	0,72 - 11,72	0,686
CD25+FOXP3+CD62L+	6,38 \pm 6,46	2,93	1,90 - 17,35	0,54 \pm 0,21	0,45	0,29 - 0,79	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	25,66 \pm 14,07	29,25	8,42 - 41,87	1,04 \pm 0,58	0,87	0,56 - 2,01	0,043
IFN γ R+	7,22 \pm 5,72	9,07	1,34 - 14,39	2,70 \pm 2,08	1,23	1,18 - 5,39	0,043

Tab. 18: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kindern mit einer Erstmanifestation. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	3,52 \pm 3,59	2,26	0,55 - 8,96	4,75 \pm 2,67	4,41	1,46 - 8,81	0,893
IFN γ	8,17 \pm 7,76	5,02	1,33 - 18,32	4,59 \pm 4,33	3,4	1,83 - 12,18	0,043
IL17+IFN γ +	1,19 \pm 1,44	0,27	0,10 - 3,11	1,32 \pm 0,73	1,36	0,40 - 2,30	0,043
Ki67+	16,72 \pm 15,30	10,84	2,19 - 40,00	2,11 \pm 1,35	1,95	0,72 - 3,89	0,225
Ki67+IFN γ +	3,81 \pm 4,64	0,86	0,06 - 9,29	0,86 \pm 0,75	0,72	0,18 - 1,97	0,043
Ki67+IL17+	1,66 \pm 1,91	0,95	0,01 - 4,41	1,03 \pm 0,81	0,83	0,29 - 2,27	0,225
Ki67+IL17+IFN γ +	0,74 \pm 0,99	0,11	0,00 - 2,12	0,60 \pm 0,43	0,68	0,17 - 1,18	0,225
CD45RO-CD27+	58,19 \pm 20,19	63,91	26,37 - 80,62	78,22 \pm 9,08	80,17	62,60 - 85,64	0,080
CD45RO-CD27+IL17+	0,91 \pm 1,10	0,5	0,19 - 2,82	2,66 \pm 2,30	1,62	0,72 - 6,43	0,686
CD45RO+CD27+	31,29 \pm 17,00	28,4	9,81 - 55,87	8,50 \pm 1,78	9,12	6,14 - 10,19	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	1,39 \pm 1,28	1,18	0,07 - 2,76	0,97 \pm 0,31	1,04	0,57 - 1,31	0,225
CD45RO+CD27-	6,61 \pm 3,28	6,87	2,85 - 11,62	8,77 \pm 5,67	6,99	3,92 - 18,54	0,893
CD45RO+CD27-IL17+	0,78 \pm 0,92	0,16	0,11 - 2,07	0,86 \pm 0,58	0,95	0,15 - 1,68	0,104
CD45RO-CD27-	3,91 \pm 1,79	4,32	1,66 - 6,13	4,51 \pm 2,92	3,37	1,32 - 8,94	0,138
CD45RO-CD27-IL17+	0,63 \pm 0,80	0,33	0,10 - 2,03	0,67 \pm 0,36	0,67	0,16 - 1,09	0,892
CD25+FOXP3+	36,68 \pm 17,32	36,83	15,07 - 60,64	6,62 \pm 2,87	6,64	3,03 - 11,00	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	24,49 \pm 9,90	22,98	10,97 - 38,41	2,93 \pm 1,33	2,63	1,32 - 4,86	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,13 \pm 0,16	0,08	0,00 - 0,39	0,02 \pm 0,03	0,01	0,00 - 0,07	0,068
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,02 \pm 0,94	0,83	0,10 - 2,35	0,10 \pm 0,07	0,08	0,01 - 0,17	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,51 \pm 0,76	0,25	0,03 - 1,85	0,58 \pm 0,50	0,34	0,18 - 1,43	0,686
CD25+FOXP3+IL17+	2,65 \pm 2,00	1,98	0,26 - 5,09	1,13 \pm 0,78	0,85	0,24 - 2,27	0,043
CD25+FOXP3+CD62L+	8,47 \pm 4,78	7,87	3,50 - 16,10	0,60 \pm 0,25	0,58	0,32 - 0,97	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	15,35 \pm 12,97	13,29	5,36 - 37,09	0,84 \pm 0,56	0,72	0,29 - 1,76	0,043
IFN γ R+	3,87 \pm 2,38	3,11	1,96 - 8,02	3,08 \pm 1,96	1,90	1,30 - 5,42	0,345

Tab. 19: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kinder-Kontrollprobanden. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

3.1.3.2 Beeinflussung des T-Zell Verhaltens bei spezifischer Stimulation

Nach Abschluss der Untersuchung der Unterschiede durch die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und aCD3/aCD28, wurden die Zellen auf Unterschiede zwischen den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus und den Kontrollpatienten bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen untersucht.

Verteilung der T-Zell Subpopulationen nach in vitro Stimulation

Bei Betrachtung der Verteilung der T-Zell-Subpopulationen nach Stimulation mit *C. albicans* zeigten sich zwischen den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 und den Kontrollpatienten keine signifikanten Unterschiede für die naiven, Memory und terminal differenzierten T-Lymphozyten.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Die Untersuchung der Proliferation durch Bestimmung von Ki67 ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion in Folge der Zellkultur

Die Untersuchung der IL17- und IFN γ -Produktion ergab ebenso wie die Betrachtung der IL17+/IFN γ doppelt positiven Zellen sowohl insgesamt als auch innerhalb der Ki67+ Zellen keine signifikanten Unterschiede.

Auch die Untersuchung der IL17 Produktion innerhalb der T-Zell-Subpopulationen (CD45RO \pm CD27 \pm) und der Expression des IFN γ -Rezeptors zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Verhalten der T-Zell Regulierung nach Kultivierung

Die quantitative Untersuchung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen erbrachte einen Trend zu höheren Prozentwerten bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (siehe Abb. 12 und Abb. 11).

Die Untersuchung der IL10- und IL17-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten erbrachte, ebenso wie die Expression von CD62L und Ki67 auf den regulatorischen Zellen keine signifikanten Unterschiede.

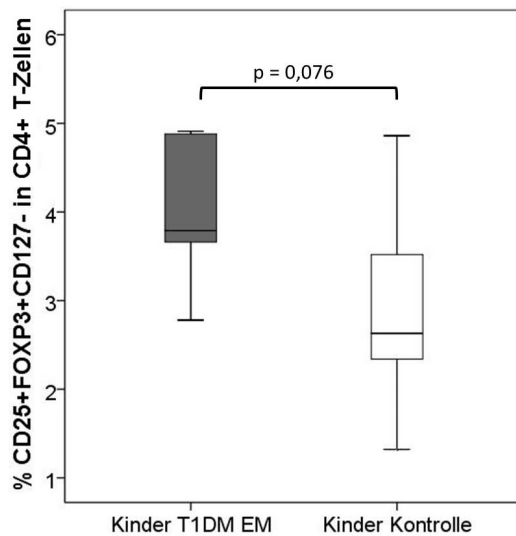


Abb. 11: Anteil der CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und den Kontrollpatienten

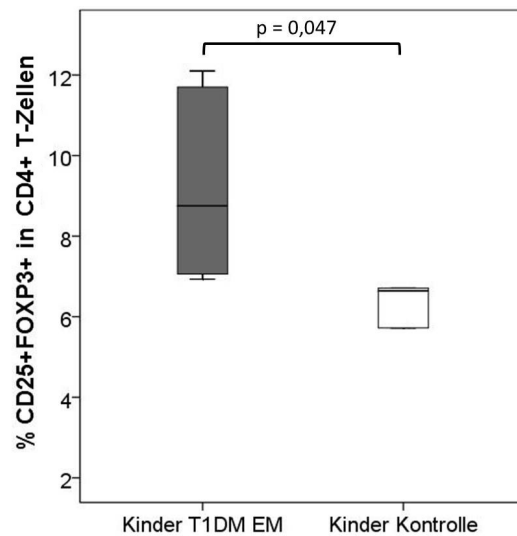


Abb. 12: Anteil der CD25+FOXP3+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und den Kontrollpatienten

3.1.4 Untersuchung des T-Zell Verhaltens innerhalb weiterer Gruppen an Diabetes erkrankter Probanden bei unspezifischer Stimulation

3.1.4.1 Vergleich der Kinder mit einem länger bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Vergleiches der Kinder mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes mellitus und der Kontrollpatienten unter unspezifischer Stimulation dargestellt.

Verteilung der T-Zell Subpopulationen nach in vitro Stimulation

Die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen zwischen Kindern mit länger bestehendem Diabetes mellitus Typ 1 und Kontrollpatienten zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Es zeigte sich bezüglich der mittels Ki67 bestimmten proliferativen Aktivität kein signifikanter Unterschied.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion in Folge der Zellkultur

Die Untersuchung der Produktion von IL17 und IFN γ und die Verteilung der für IL17 und IFN γ doppelt positiven T-Lymphozyten insgesamt und innerhalb der Ki67+ Zellen zeigte ebenso wie die IL17-Produktion innerhalb der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen (CD45RO \pm CD27 \pm) keine signifikanten Unterschiede.

Bei Betrachtung der Expression des IFN γ -Rezeptors zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Verhalten der T-Zell Regulierung nach Kultivierung

Die Untersuchung der quantitativen Verhältnisse bei den CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

In der Untergruppe der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte bei den Kontrollpatienten (siehe Abb. 13).

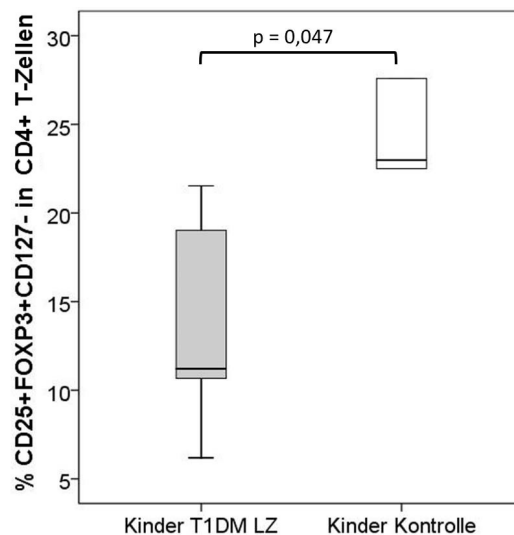


Abb. 13: Anteil der CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einem länger bestehendem Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten

Bei Begutachtung der Zytokinproduktion innerhalb der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich ebenso wie in der Untergruppe der CD127 negativen CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede in der IL10- und IL17-Produktion.

Bei der Untersuchung der proliferativen Aktivität der CD25+FOXP3+ regulatorischen zeigten sich ebenso wie in der Expression von CD62L keine signifikanten Unterschiede zwischen Diabetikern und Kontrollen.

3.1.4.2 Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den gesunden Kontrollpatienten

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Vergleiches der erwachsenen Diabetiker und der Kontrollpatienten unter unspezifischer Stimulation dargestellt.

Verteilung der T-Zell Subpopulationen nach in vitro Stimulation

Bei den naiven, Memory, Effektor und terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Bei der Untersuchung der proliferativen Aktivität der T-Lymphozyten anhand der Expression von Ki67 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion in Folge der Zellkultur

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen den erwachsenen Diabetikern und den Kontrollpatienten bezüglich der IFN γ - und IL17-Produktion.

Im Weiteren wurde die proinflammatorische Aktivität der T-Lymphozyten in der Gruppe der Ki67 positiven T-Lymphozyten untersucht. Hierbei zeigten sich für die Ki67+IL17+, Ki67+IFN γ + und Ki67+IL17+IFN γ + Zellen keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Untersuchung der IL17 Produktion in den T-Zell Subpopulationen zeigte sich ein Trend zu einer bei den Diabetikern erhöhten Anzahl an IL17 positiven Memory-Zellen (siehe Abb. 14).

Die Untersuchung der Expression des IFN γ -Rezeptors erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Verhalten der T-Zell Regulation nach Stimulation

In der quantitativen Untersuchung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127-regulatorischen T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Für IL17 und IL10 zeigten sich in der Subpopulation der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten signifikant höhere Werte bei den Diabetikern (siehe Abb. 15 und Abb. 16).

Bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens der regulatorischen T-Lymphozyten zeigte sich ebenso wie für die Expression des CD62L auf regulatorischen T-Lymphozyten kein signifikanter Unterschied.

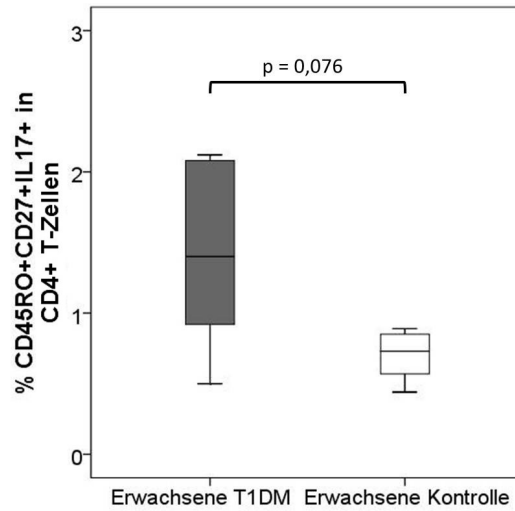


Abb. 14: Anteil der CD45+CD27+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

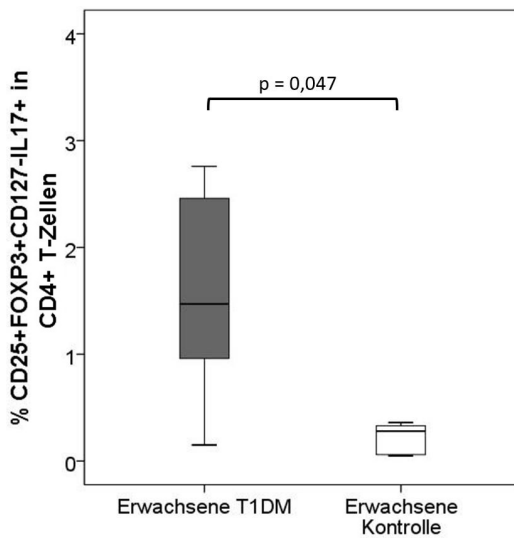


Abb. 15: Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

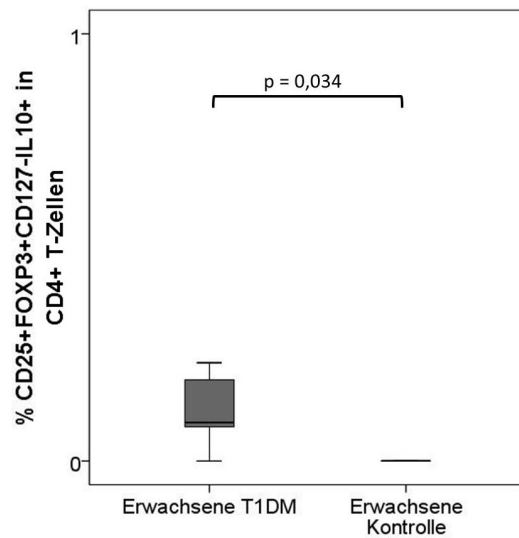


Abb. 16: Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL10+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

3.1.5 Untersuchung des T-Zell Verhaltens innerhalb weiterer Gruppen an Diabetes erkrankter Probanden bei spezifischer Stimulation

3.1.5.1 Stimulusabhängige Unterschiede des T-Zell-Verhaltens bei den Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes

Um den Einfluss der Stimulation mit aCD3/aCD28 oder *C. albicans*-Antigen zu beurteilen, wurden die jeweiligen Versuchsansätze innerhalb der Gruppen miteinander verglichen. Die Daten sind in Tabelle 20 dargestellt.

Verteilung der T-Zell Subpopulationen

In der Gruppe der Kinder mit einem länger bestehendem Diabetes zeigte sich für die Verteilung naiver T-Lymphozyten ein Trend zu höheren Werten unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen. Bei den Memory-T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28. Die Verteilung der Effektor- und der terminal differenzierten T-Lymphozyten wies keine signifikanten Unterschiede auf.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Bei den Kindern mit einem länger bestehendem Diabetes zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion

Bei den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die IL17-Produktion. Die Untersuchung der IFN γ -Produktion erbrachte einen Trend zu höheren Werte unter Stimulation mit aCD3/aCD28 und bei den für IL17 und IFN γ doppelt positiven Zellen zeigten sich signifikant höhere Werte bei Stimulation mit *C. albicans*.

Für die IL17-Produktion und die IL17 und IFN γ doppelt positiven Ki67+ T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Bei Betrachtung der IFN γ -Produktion durch die Ki67+ Zellen zeigten sich signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei den Diabetikern zeigte sich für die IL17-Produktion innerhalb der T-Zell-Subpopulationen kein signifikanter Unterschied.

Die Begutachtung der Expression des IFN γ -Rezeptors zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Verhalten der T-Zell Regulation

Die Untersuchung der quantitativen Verteilung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten bei den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes erbrachte unter proinflammatorischen Bedingungen signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei Betrachtung der IL10-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Für die IL17-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Prozentwerten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Für die IL10- und die IL17-Produktion in der Untergruppe der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Werte unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 und CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigte signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	2,08 \pm 1,61	1,88	0,36 - 4,72	1,90 \pm 0,59	1,61	1,30 - 2,67	0,893
IFNγ	3,98 \pm 1,19	3,96	2,81 - 5,63	2,24 \pm 1,05	2,2	1,04 - 3,70	0,043
IL17+IFNγ+	0,51 \pm 0,31	0,54	0,07 - 0,83	1,00 \pm 0,49	0,95	0,48 - 1,62	0,043
Ki67+	13,36 \pm 6,93	17,21	4,73 - 20,29	6,95 \pm 9,02	3,04	1,11 - 22,79	0,225
Ki67+IFNγ+	1,99 \pm 0,92	1,44	1,31 - 3,40	0,68 \pm 0,49	0,44	0,25 - 1,22	0,043
Ki67+IL17+	1,27 \pm 0,94	1,24	0,10 - 2,19	0,61 \pm 0,40	0,5	0,25 - 1,23	0,225
Ki67+IL17+IFNγ+	0,31 \pm 0,20	0,31	0,01 - 0,52	0,43 \pm 0,30	0,4	0,18 - 0,92	0,225
CD45RO-CD27+	72,12 \pm 7,21	72,57	64,46 - 81,24	85,49 \pm 6,39	88,99	75,69 - 90,80	0,080
CD45RO-CD27+IL17+	0,94 \pm 0,91	0,67	0,16 - 2,51	0,84 \pm 0,22	0,92	0,49 - 1,06	0,686
CD45RO+CD27+	21,16 \pm 5,75	21,09	15,32 - 27,42	5,76 \pm 3,09	6,34	2,74 - 10,12	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	1,03 \pm 0,71	1,08	0,17 - 2,00	0,53 \pm 0,25	0,64	0,22 - 0,82	0,225
CD45RO+CD27-	3,61 \pm 1,93	4,11	1,31 - 5,53	3,91 \pm 2,88	3,2	1,38 - 8,84	0,893
CD45RO+CD27-IL17+	0,21 \pm 0,11	0,23	0,05 - 0,34	0,48 \pm 0,40	0,41	0,14 - 1,16	0,104
CD45RO-CD27-	3,11 \pm 1,39	2,55	1,57 - 5,04	4,84 \pm 2,09	5,1	1,47 - 7,22	0,138
CD45RO-CD27-IL17+	0,16 \pm 0,15	0,13	0,05 - 0,42	0,17 \pm 0,07	0,21	0,07 - 0,23	0,892
CD25+FOXP3+	20,94 \pm 5,31	20,33	13,09 - 27,42	5,34 \pm 2,21	4,33	3,62 - 8,93	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	13,72 \pm 6,35	11,21	6,19 - 21,53	2,21 \pm 0,62	1,99	1,42 - 3,01	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,07 \pm 0,06	0,03	0,01 - 0,14	0,01 \pm 0,01	0,00	0,00 - 0,02	0,042
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,31 \pm 0,26	0,38	0,03 - 0,59	0,03 \pm 0,03	0,02	0,00 - 0,08	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,49 \pm 0,75	0,29	0,02 - 1,81	0,43 \pm 0,25	0,51	0,12 - 0,69	0,686
CD25+FOXP3+IL17+	2,18 \pm 2,27	1,82	0,27 - 5,91	0,57 \pm 0,46	0,49	0,12 - 1,33	0,042
CD25+FOXP3+CD62L+	5,90 \pm 2,14	5,29	3,62 - 9,39	0,67 \pm 0,46	0,47	0,31 - 1,43	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	7,55 \pm 5,18	5,54	2,83 - 13,81	0,47 \pm 0,16	0,44	0,31 - 0,72	0,043
IFNγR+	2,63 \pm 2,11	1,22	0,87 - 5,04	2,47 \pm 1,52	2,07	1,02 - 4,36	0,893

Tab. 20: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den länger an Diabetes erkrankten Kindern. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

3.1.5.2 Vergleich der Kinder mit einem länger bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten

Verteilung der T-Zell Subpopulationen nach in vitro Stimulation

Die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen bei spezifischer Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen zeigte für die naiven, Memory- und die terminal differenzierten T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede. Bei den Effektor T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Werten bei den Kontrollpatienten (siehe Abb. 17).

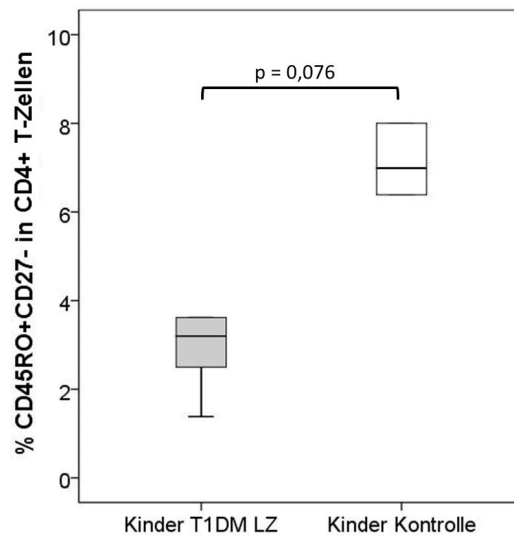


Abb. 17: Anteil der CD45+CD27-T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Für die Expression von Ki67 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion in Folge der Zellkultur

Die Untersuchung der Gesamtproduktion von IL17 zeigte einen Trend zu höheren Werten bei den Kontrollpatienten (siehe Abb. 18).

Bezüglich der $IFN\gamma$ -Produktion und der für IL17 und $IFN\gamma$ doppelt positiven T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Die Begutachtung der Zytokinproduktion innerhalb der Ki67 positiven T-Lymphozyten erbrachte für IL17+, $IFN\gamma$ + und für die Ki67+IL17+ $IFN\gamma$ + T-Lymphozyten kei-

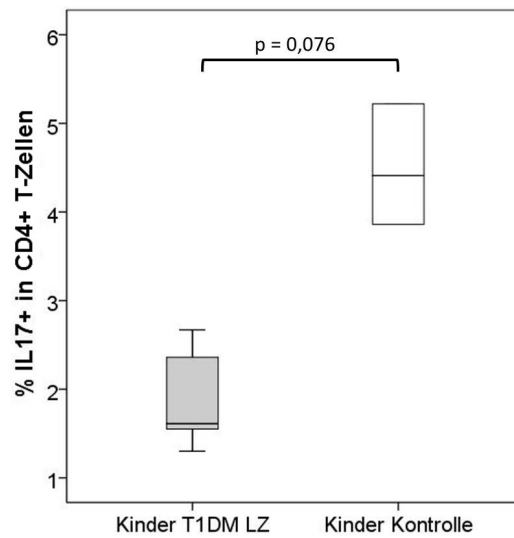


Abb. 18: Anteil der IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten

ne signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Innerhalb der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zeigte sich bezüglich der IL17-Produktion für die naiven T-Lymphozyten ein Trend zu höheren Werten bei den Kontrollpatienten (siehe Abb. 19).

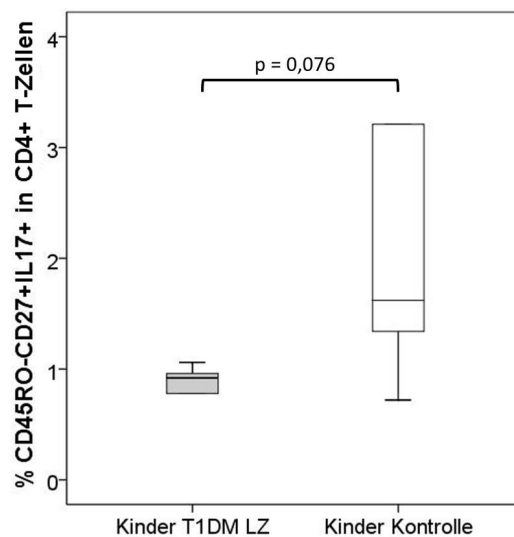


Abb. 19: Anteil der CD45-CD27+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten

Für die IL17-Produktion durch die Effektor-T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

In der Gruppe der Memory- und der terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Werten bei den Kontrollpatienten (siehe Abb. 20 und 21).

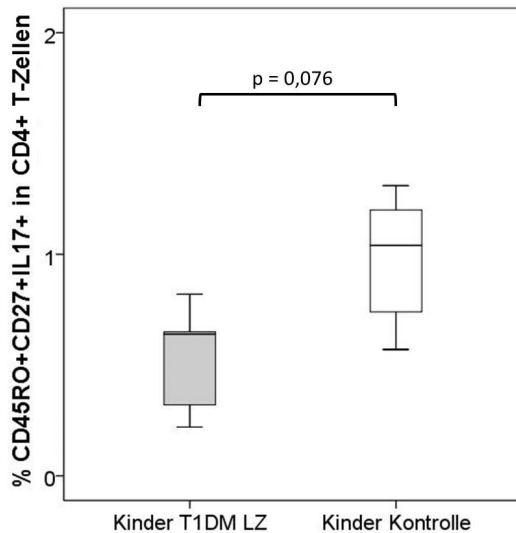


Abb. 20: Anteil der CD45+CD27+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten

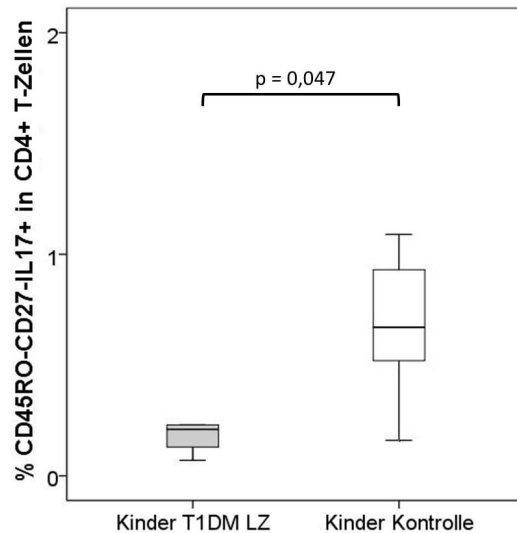


Abb. 21: Anteil der CD45-CD27-IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten

Die Untersuchung der Expression des IFN γ -Rezeptors erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Verhalten der T-Zell Regulierung nach Kultivierung

Die Untersuchung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Begutachtung der Zytokinproduktion innerhalb der Gruppe der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 und CD62L auf den regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.1.5.3 Stimulusabhängige Unterschiede des T-Zell-Verhaltens in den Versuchsgruppen der Erwachsenen

Um den Einfluss der Stimulation mit aCD3/aCD28 oder dem *C. albicans*-Antigen zu beurteilen, wurden die jeweiligen Versuchsansätze innerhalb der Gruppen miteinander verglichen. Die Daten sind in Tabelle 21 dargestellt.

Verteilung der T-Zell Subpopulationen

Bei den Diabetikern zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte für naive T-Lymphozyten unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Effektor- und der terminal differenzierten T-Lymphozyten. In der Subpopulation der Memory-T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Unter proinflammatorischen Bedingungen zeigte sich ein Trend zu höheren Prozentwerten an Ki67+ T-Lymphozyten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion

Es zeigte sich für die IL17-Produktion und die für IL17 und IFN γ doppelt positiven T-Lymphozyten kein signifikanter Unterschied. Die Untersuchung der IFN γ -Produktion erbrachte signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Betrachtung der Ki67+IL17+ und der Ki67+IL17+IFN γ + T-Lymphozyten erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Die Untersuchung der IFN γ -Produktion innerhalb der Ki67+ T-Lymphozyten erbrachte einen Trend zu höheren Werten durch Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei den naiven T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Werten für die IL17-Produktion unter Stimulation mit *C. albicans*.

Die IL17-Produktion innerhalb der Memory-, der Effektor und der terminal differenzierten T-Lymphozyten wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimuli auf.

Die Expression des IFN γ -Rezeptors zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Verhalten der T-Zell Regulation

In der Gruppe der Diabetiker zeigten sich signifikant erhöhte Werte in der quantitativen Bestimmung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei den erwachsenen Diabetikern zeigte sich kein Unterschied in der IL10-Produktion der regulatorischen T-Lymphozyten. Für die IL17 Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ Zellen zeigte sich ein Trend zu höheren Prozentwerten

unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei Betrachtung der proliferativen Aktivität der regulatorischen T-Lymphozyten und der CD62L-Expression zeigten sich Trends zu erhöhten Werten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	3,01 \pm 0,79	3,14	2,14 - 3,99	3,08 \pm 1,67	2,61	1,62 - 5,90	0,500
IFN γ	15,36 \pm 7,09	18,26	6,95 - 21,85	5,02 \pm 3,39	5,44	1,36 - 9,94	0,043
IL17+IFN γ +	1,30 \pm 0,49	1,24	0,84 - 2,11	1,47 \pm 1,28	1,17	0,34 - 3,67	0,500
Ki67+	23,12 \pm 22,82	22,86	0,84 - 58,21	2,66 \pm 1,76	3,13	0,27 - 4,81	0,080
Ki67+IFN γ +	7,65 \pm 6,38	9,04	0,35 - 15,60	0,96 \pm 0,80	0,66	0,07 - 1,85	0,080
Ki67+IL17+	1,17 \pm 0,89	1,58	0,10 - 2,18	0,69 \pm 0,51	0,55	0,09 - 1,40	0,138
Ki67+IL17+IFN γ +	0,78 \pm 0,60	0,56	0,10 - 1,53	0,68 \pm 0,55	0,48	0,07 - 1,44	0,686
CD45RO-CD27+	46,08 \pm 17,13	38,04	26,83 - 67,81	73,32 \pm 9,59	73,24	59,49 - 85,73	0,043
CD45RO-CD27+IL17+	0,44 \pm 0,53	0,19	0,07 - 1,33	0,90 \pm 0,68	0,66	0,42 - 2,09	0,080
CD45RO+CD27+	41,97 \pm 18,96	49,68	13,21 - 60,75	14,32 \pm 6,57	15,83	7,79 - 23,65	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	1,40 \pm 0,71	1,4	0,50 - 2,12	0,93 \pm 0,75	0,77	0,32 - 2,18	0,345
CD45RO+CD27-	8,57 \pm 3,43	10	3,13 - 11,33	8,02 \pm 2,95	8,36	3,38 - 11,62	0,686
CD45RO+CD27-IL17+	1,08 \pm 0,75	0,62	0,43 - 1,91	0,92 \pm 0,72	0,72	0,18 - 2,10	0,686
CD45RO-CD27-	3,38 \pm 2,55	2,67	1,33 - 7,65	4,34 \pm 1,67	4,66	2,63 - 6,47	0,345
CD45RO-CD27-IL17+	0,25 \pm 0,24	0,14	0,03 - 0,65	0,33 \pm 0,27	0,22	0,11 - 0,80	0,786
CD25+FOXP3+	44,91 \pm 24,45	56,67	8,22 - 69,34	6,65 \pm 3,49	7,73	2,01 - 10,68	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	34,70 \pm 19,92	40,76	5,89 - 59,17	2,96 \pm 1,47	3,26	0,50 - 4,22	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,12 \pm 0,09	0,09	0,00 - 0,23	0,04 \pm 0,04	0,04	0,01 - 0,11	0,225
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,56 \pm 1,07	1,47	0,15 - 2,76	0,16 \pm 0,10	0,11	0,09 - 0,32	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,39 \pm 0,27	0,36	0,10 - 0,82	0,71 \pm 0,61	0,70	0,01 - 1,47	0,225
CD25+FOXP3+IL17+	1,90 \pm 1,37	2,05	0,23 - 3,59	0,63 \pm 0,53	0,47	0,15 - 1,55	0,080
CD25+FOXP3+CD62L+	4,85 \pm 3,10	4,68	0,23 - 8,36	0,52 \pm 0,18	0,57	0,21 - 0,65	0,080
CD25+FOXP3+Ki67+	15,24 \pm 20,81	8,50	0,00 - 51,03	0,59 \pm 0,50	0,39	0,02 - 1,22	0,080
IFN γ R+	2,59 \pm 1,14	1,84	1,77 - 4,34	2,19 \pm 1,45	1,44	0,69 - 3,98	0,500

Tab. 21: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den erwachsenen Diabetikern. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

3.1.5.4 Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten

Verteilung der T-Zell Subpopulationen nach in vitro Stimulation

Bei der spezifischen Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen zeigte sich bei den erwachsenen Diabetikern eine signifikante Erniedrigung der naiven T-Lymphozyten im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Abb. 22)

Bei den Effektor- und den Memory-T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte bei den Diabetikern (siehe Abb. 23 und 24).

Für die Subpopulation der terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

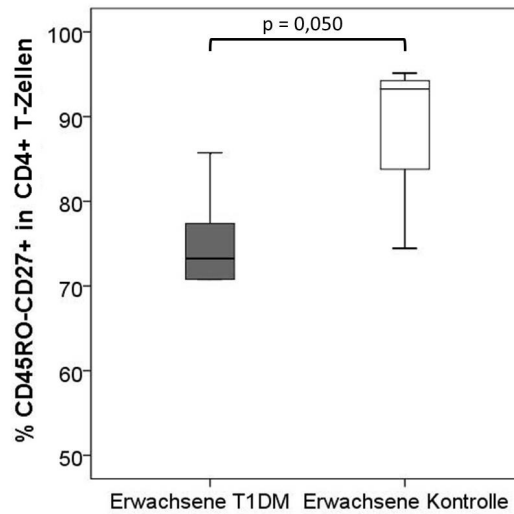


Abb. 22: Anteil der CD45-CD27+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten

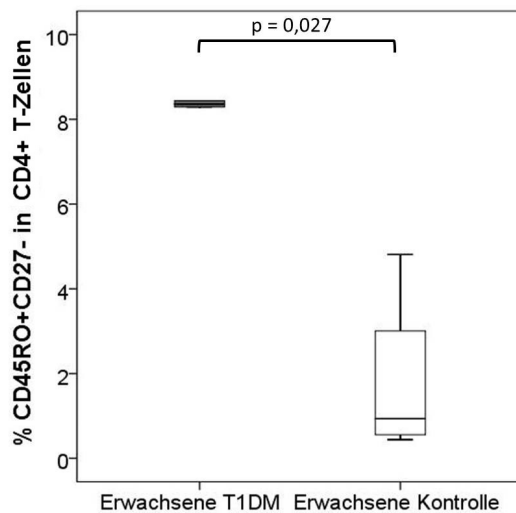


Abb. 23: Anteil der CD45+CD27- T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten

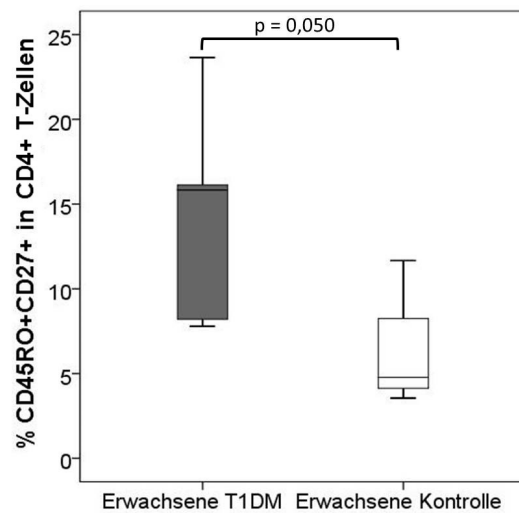


Abb. 24: Anteil der CD45+CD27+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Bezüglich der Proliferationsaktivität zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern und Kontrollen.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion in Folge der Zellkultur

In der Gesamtproduktion von $\text{IFN}\gamma$ und IL17 zeigte sich, ebenso wie für die IL17/ $\text{IFN}\gamma$ doppelt positiven T-Lymphozyten kein signifikanter Unterschied.

Bei Betrachtung der Ki67+IL17+ , der $\text{Ki67+IFN}\gamma+$ und der für IL17 und $\text{IFN}\gamma$ doppelt positiven Ki67+ T-Lymphozyten zeigten sich signifikant erhöhte Werte in der Gruppe der Diabetiker (siehe Abb. 25, 26 und 27).

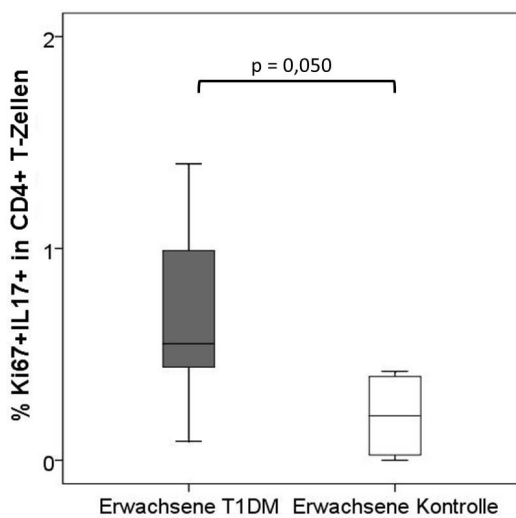


Abb. 25: Anteil der Ki67+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten

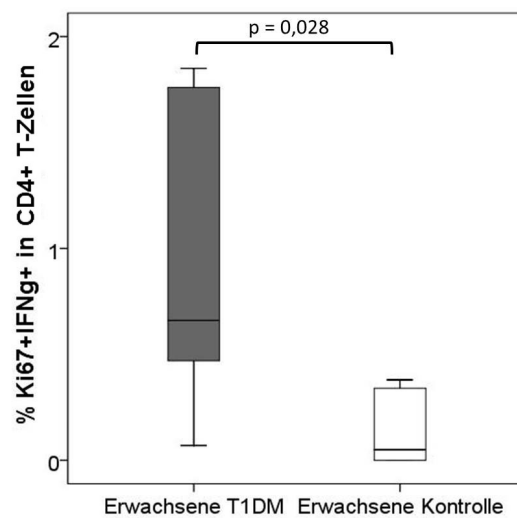


Abb. 26: Anteil der $\text{Ki67+IFN}\gamma+$ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten

Für die IL17 Produktion in den einzelnen Subpopulationen ($\text{CD45RO}\pm\text{CD27}\pm$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Für die Expression des $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptors zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Verhalten der T-Zell Regulation nach Stimulation

Für die CD25+FOXP3+ und die CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei Betrachtung der Zytokin-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

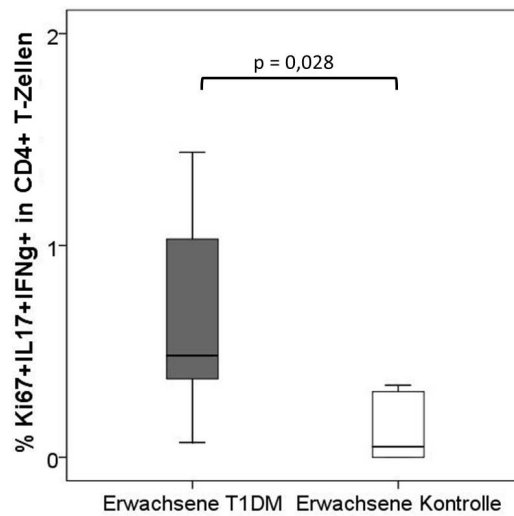


Abb. 27: Anteil der Ki67+IL17+IFN γ + T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten

Die Auswertung der proliferativen Aktivität der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte, genauso wie die Untersuchung der Expression von CD62L innerhalb dieser Zellpopulation, keine signifikanten Unterschiede.

3.1.6 Untersuchung des Verhaltens der T-Zell Regulation bei unspezifischer Stimulation in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu

Im Folgenden wird das Verhalten der T-Zell Regulation nach Kultivierung unter antiinflammatorischen Bedingungen untersucht.

3.1.6.1 Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mit den Kontrollpatienten unter antiinflammatorischen Bedingungen

Bei der Betrachtung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes und den Kontrollpatienten.

Bei der Betrachtung der Zytokinproduktion der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich für IL10 und IL17

keine signifikanten Unterschiede.

Die Untersuchung der Proliferation der regulatorischen T-Lymphozyten und der Expression von CD62L erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

3.1.6.2 Vergleich der Kinder mit einem länger bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten unter antiinflammatorischen Bedingungen

Die Untersuchung der quantitativen Verhältnisse bei den CD25+FOXP3+ und den CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zwischen den Gruppen zeigten sich bezüglich der Produktion von IL10 und IL17 durch die CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede.

In der Untergruppe der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich unter antiinflammatorischen Bedingungen signifikant höhere Prozentwerte für die IL17-Produktion bei den Kontrollpatienten (siehe Abb. 28).

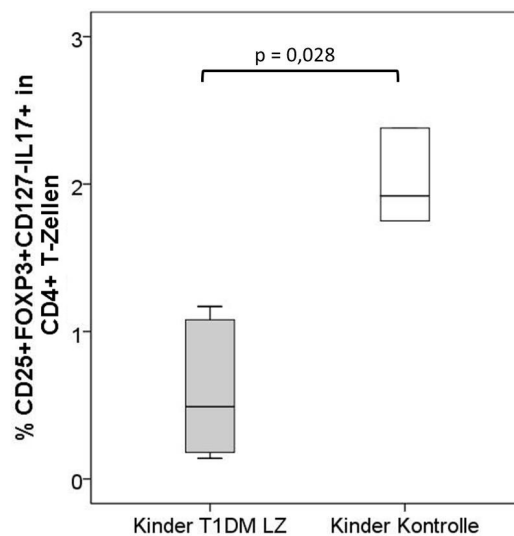


Abb. 28: Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einem länger bestehendem Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten

Die Untersuchung der Proliferation der regulatorischen T-Lymphozyten und der Expression von CD62L erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

3.1.6.3 Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten unter antiinflammatorischen Bedingungen

Für die CD25+FOXP3+ und die CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Bei Betrachtung der Zytokinproduktion zeigte sich für IL10 signifikant höhere Werte bei Patienten mit Diabetes in der Subpopulation der CD127 negativen Tregs (siehe Abb. 29).

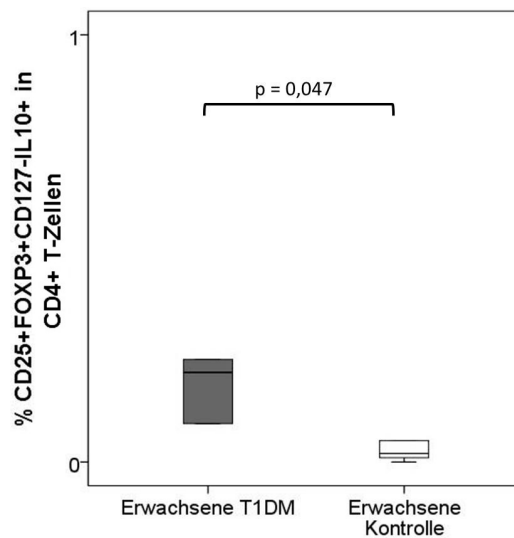


Abb. 29: Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL10+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

Die IL17-Produktion der regulatorischen T-Lymphozyten zeigte signifikant höhere Werte bei den Diabetikern (siehe Abb. 31). Auch in der Subpopulation der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Werte für IL17 bei den Diabetikern (siehe Abb. 30).

Die Untersuchung der Proliferation der regulatorischen T-Lymphozyten und der Expression von CD62L erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

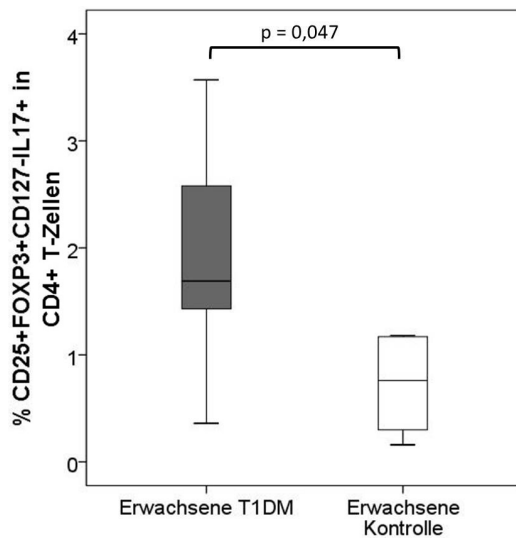


Abb. 30: Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

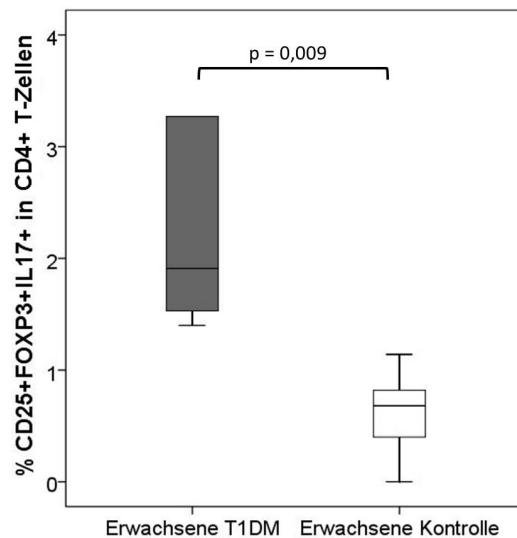


Abb. 31: Anteil der CD25+FOXP3+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

3.1.7 Untersuchung des Verhaltens der T-Zell Regulation bei spezifischer Stimulation in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu

Im Anschluss wurde das Verhalten des regulatorischen T-Zell-Systems unter spezifischer Stimulation in einem antiinflammatorischen Milieu untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

3.1.7.1 Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus und den Kontrollpatienten

Die Betrachtung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Für die IL10- und IL17-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- Tregs zeigte sich bei den Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollen kein signifikanter Unterschied.

In der Untersuchung der Expression von Ki67 und CD62L auf den regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.1.7.2 Vergleich der Kinder mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes mit den Kontrollpatienten

Die Untersuchung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigte unter antiinflammatorischen Bedingungen bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Begutachtung der Zytokinproduktion innerhalb der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten zeigte für die Produktion von IL10 und IL17 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 und CD62L erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.1.7.3 Stimulusabhängige Unterschiede des Verhaltens der T-Zell-Regulation in den Versuchsgruppen der Kinder in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu

Um den Einfluss der Stimulation mit aCD3/aCD28 oder *C. albicans*-Antigen zu beurteilen, wurden die jeweiligen Versuchsansätze innerhalb der Gruppen miteinander verglichen.

Diabetiker EM

Unter antiinflammatorischen Bedingungen zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte für die CD25+FOXP3+ und die CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei Betrachtung der IL17- und IL10-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimuli.

In der Untergruppe der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten zeigte sich unter Stimulation mit aCD3/aCD28 für die Produktion von IL10 ein Trend zu höheren Werten und für die IL17-Produktion zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 und CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten erbrachte signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	
CD25+FOXP3+	56,01 ± 18,14	55,91	31,42 - 73,89	8,86 ± 2,45	8,26	6,62 - 13,00	0,043

CD25+FOXP3+CD127-	48,10 ± 15,45	48,65	27,16 - 68,51	3,16 ± 2,38	3,48	0,17 - 5,50	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	1,00 ± 1,83	0,12	0,03 - 4,25	0,05 ± 0,04	0,04	0,01 - 0,09	0,080
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	2,44 ± 1,86	2,47	0,42 - 5,17	0,27 ± 0,26	0,21	0,06 - 0,71	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	1,89 ± 3,33	0,22	0,12 - 7,81	0,81 ± 0,42	0,84	0,41 - 1,44	0,893
CD25+FOXP3+IL17+	3,25 ± 4,03	1,33	0,81 - 10,33	2,20 ± 0,52	2,16	1,75 - 3,06	0,686
CD25+FOXP3+CD62L+	7,77 ± 11,69	2,49	1,20 - 28,50	0,27 ± 0,14	0,23	0,16 - 0,50	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	35,35 ± 19,58	43,80	12,76 - 55,34	4,11 ± 1,51	3,73	2,24 - 5,82	0,043
IFNyR+	10,12 ± 7,45	10,22	2,18 - 20,96	3,07 ± 3,28	1,62	0,66 - 8,60	0,043

Tab. 22: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes. Die Werte für Mittelwert±SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

Diabetiker LZ

Unter antiinflammatorischen Bedingungen zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte für die CD25+FOXP3+ und CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei Betrachtung der IL10- und IL17-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimuli.

In der Untergruppe der CD127 negativen T-Lymphozyten zeigten sich für die IL10-Produktion ein Trend zu höheren Werten und für die IL17-Produktion signifikant höhere Prozentwerte unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 und CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigte signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	
CD25+FOXP3+	40,89 ± 10,63	39,55	29,42 - 57,90	4,46 ± 1,99	4,19	1,73 - 6,46	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	30,19 ± 14,04	32,02	7,26 - 44,52	1,50 ± 0,96	1,42	0,74 - 3,09	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,14 ± 0,19	0,02	0,00 - 0,44	0,02 ± 0,03	0,00	0,00 - 0,08	0,066
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,61 ± 0,49	0,49	0,14 - 1,17	0,12 ± 0,22	0,03	0,02 - 0,52	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,54 ± 0,54	0,59	0,03 - 1,35	0,31 ± 0,15	0,39	0,09 - 0,44	0,345
CD25+FOXP3+IL17+	1,24 ± 0,83	0,82	0,64 - 2,62	0,65 ± 0,35	0,73	0,06 - 1,00	0,500
CD25+FOXP3+CD62L+	11,31 ± 3,92	10,15	7,10 - 17,57	0,30 ± 0,20	0,20	0,18 - 0,65	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	14,44 ± 8,64	12,28	3,09 - 23,74	1,26 ± 0,82	1,66	0,23 - 2,17	0,043
IFNyR+	10,04 ± 6,03	9,95	1,54 - 18,22	2,66 ± 1,79	2,10	1,52 - 5,84	0,043

Tab. 23: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes. Die Werte für Mittelwert±SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

Kontrollen

Unter antiinflammatorischen Bedingungen zeigten sich signifikant höhere Prozentwerte für die CD25+FOXP3+ und CD25+FOXP3+CD127- regulatorischen T-Lymphozyten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Bei Betrachtung der IL10-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimuli.

Für die IL17-Produktion innerhalb der CD25+FOXP3+-Zellen zeigten sich unter antiinflammatorischen Bedingungen signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Unter antiinflammatorischen Bedingungen zeigten sich für die IL10- und IL17-Produktion in der Untergruppe der CD127 negativen T-Lymphozyten signifikant höhere Prozentwerte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der Expression von Ki67 und CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigte signifikant höhere Werte bei Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	
CD25+FOXP3+	50,23 ± 17,74	46,10	27,48 - 74,82	7,05 ± 5,52	5,04	2,63 - 16,38	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	40,97 ± 13,55	40,27	21,54 - 57,97	3,14 ± 2,87	2,24	0,53 - 7,40	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,23 ± 0,25	0,14	0,03 - 0,65	0,03 ± 0,03	0,01	0,00 - 0,07	0,042
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	2,23 ± 1,49	1,92	0,52 - 4,60	0,26 ± 0,37	0,10	0,01 - 0,90	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,68 ± 0,81	0,50	0,04 - 2,08	0,48 ± 0,42	0,26	0,10 - 0,94	0,686
CD25+FOXP3+IL17+	5,08 ± 5,07	2,85	0,64 - 11,66	2,01 ± 2,01	1,81	0,27 - 5,30	0,043
CD25+FOXP3+CD62L+	13,76 ± 9,32	11,56	4,88 - 27,91	0,44 ± 0,22	0,45	0,18 - 0,69	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	28,36 ± 14,69	30,10	11,50 - 48,87	2,46 ± 1,96	1,95	0,72 - 5,49	0,043
IFN γ R+	13,87 ± 12,88	8,22	6,15 - 36,57	2,43 ± 1,32	3,06	0,62 - 3,53	0,043

Tab. 24: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kinder-Kontrollpatienten. Die Werte für Mittelwert±SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

3.1.7.4 Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten

Unter antiinflammatorischen Bedingungen entstanden in der Gruppe der Diabetiker signifikant mehr CD25+FOXP3+ und CD25+FOXP3+CD127-regulatorische T-Lymphozyten als bei den Kontrollen (siehe Abb. 33 und Abb. 32).

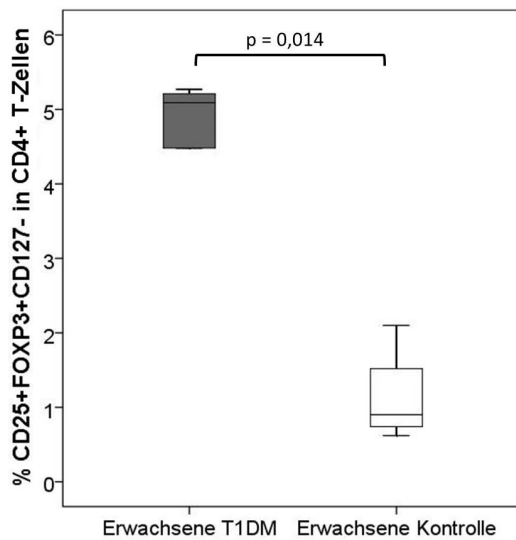


Abb. 32: Anteil der CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

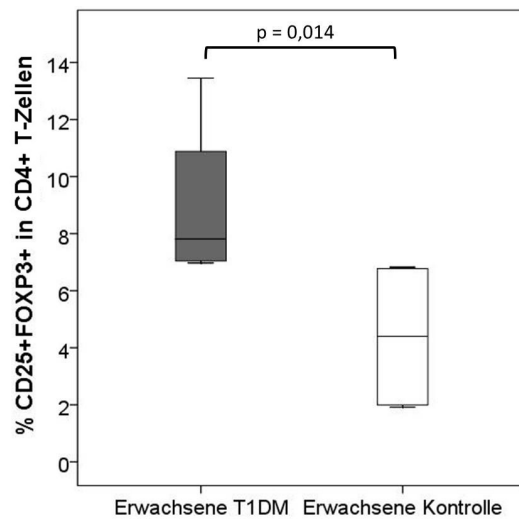


Abb. 33: Anteil der CD25+FOXP3+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

Zwischen den Patienten mit Diabetes und den gesunden Kontrollen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Produktion von IL10 durch die CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten. Es zeigten sich aber signifikant höhere Werte für die CD25+FOXP3+IL17+ T-Lymphozyten (siehe Abb. 34).

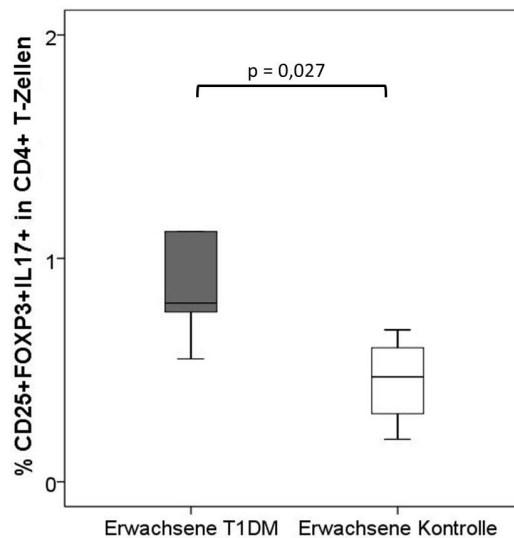


Abb. 34: Anteil der CD25+FOXP3+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten

Die Auswertung der proliferativen Aktivität der CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte, genauso wie die Untersuchung der CD62L Ex-

pression innerhalb dieser Zellpopulation keine signifikanten Unterschiede.

3.1.7.5 Stimulusabhängige Unterschiede des Verhaltens der T-Zell-Regulation in den Versuchsgruppen der Erwachsenen in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu

Um den Einfluss der Stimulation mit aCD3/aCD28 oder *C. albicans*-Antigen zu beurteilen, wurden die jeweiligen Versuchsansätze innerhalb der Gruppen miteinander verglichen.

Diabetiker

Es zeigten sich in der Diabetiker Gruppe signifikant mehr CD25+FOXP3+ und CD25+FOXP3+CD127- Zellen unter Stimulation mit aCD3/aCD28 als durch *C. albicans*-Stimulation.

Bei den erwachsenen Diabetikern zeigte sich weiter ein Trend zu erhöhten Werten für die IL10-Produktion der CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten und signifikant höhere Werte für die IL17-Produktion unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Für die Ki67- und CD62L-Expression auf regulatorischen T-Lymphozyten zeigten sich signifikant höhere Werte unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max	
CD25+FOXP3+	58,38 ± 23,08	65,01	20,58 - 81,28	9,23 ± 2,85	7,81	6,97 - 13,45	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	50,64 ± 20,23	55,80	18,41 - 73,00	4,63 ± 0,91	5,09	3,11 - 5,27	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,35 ± 0,43	0,21	0,09 - 1,11	0,04 ± 0,05	0,01	0,00 - 0,12	0,080
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,93 ± 1,21	1,69	0,36 - 3,57	0,36 ± 0,19	0,29	0,17 - 0,64	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,73 ± 0,83	0,41	0,09 - 2,15	0,41 ± 0,46	0,22	0,02 - 1,20	0,080
CD25+FOXP3+IL17+	2,94 ± 2,17	1,91	1,40 - 6,58	1,17 ± 0,84	0,80	0,55 - 2,63	0,043
CD25+FOXP3+CD62L+	4,55 ± 2,47	4,23	1,26 - 7,54	0,25 ± 0,13	0,23	0,10 - 0,42	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	20,96 ± 26,70	11,61	2,45 - 66,77	2,01 ± 1,93	1,50	0,24 - 5,15	0,043
IFNyR+	7,35 ± 3,34	6,94	3,15 - 11,52	3,59 ± 3,44	2,48	1,10 - 9,53	0,043

Tab. 25: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den erwachsenen Diabetikern. Die Werte für Mittelwert±SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

Kontrollen

Bei den Kontrollpatienten zeigte sich bei der Betrachtung der CD25+FOXP3+ und der CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten ein Trend zu höheren Prozentwerten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die Untersuchung der IL10- und IL17-Produktion durch die regulatorischen T-Lymphozyten erbrachte bei den erwachsenen Kontrollen keinen signifikanten

Unterschied durch den Stimulus.

Für die Expression von Ki67 und CD62L auf regulatorischen T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Werten unter Stimulation mit aCD3/aCD28.

	Unspezifische Stimulation			Spezifische Stimulation			p-WERT
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
CD25+FOXP3+	37,03 \pm 20,12	32,11	21,17 - 71,96	4,39 \pm 2,76	4,40	1,92 - 6,82	0,068
CD25+FOXP3+CD127-	27,83 \pm 20,76	19,92	14,90 - 64,60	1,13 \pm 0,66	0,90	0,62 - 2,10	0,068
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,06 \pm 0,09	0,02	0,00 - 0,22	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00 - 0,00	0,109
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,71 \pm 0,48	0,76	0,16 - 1,18	0,02 \pm 0,03	0,01	0,00 - 0,07	0,068
CD25+FOXP3+IL10+	0,31 \pm 0,29	0,21	0,03 - 0,65	0,21 \pm 0,33	0,06	0,02 - 0,71	0,715
CD25+FOXP3+IL17+	0,61 \pm 0,43	0,68	0,00 - 1,14	0,45 \pm 0,21	0,47	0,19 - 0,68	0,465
CD25+FOXP3+CD62L+	11,97 \pm 10,96	7,1	2,02 - 29,92	0,97 \pm 1,31	0,42	0,11 - 2,91	0,068
CD25+FOXP3+Ki67+	7,27 \pm 5,49	6,19	1,67 - 16,46	0,94 \pm 0,43	0,99	0,39 - 1,40	0,068
IFNyR+	6,61 \pm 4,90	6,75	0,87 - 12,81	2,23 \pm 1,65	2,17	0,31 - 4,28	0,068

Tab. 26: Vergleich zwischen der Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den erwachsenen Kontrollpatienten. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

3.2 Suppressionsversuche

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Suppressionsversuche dargestellt.

3.2.1 Auswertung der Reinheit CD4+ T-Lymphozyten nach MACS Isolation vor Treg Induktion

Die CD25 positiven T-Lymphozyten wurden aus naiven T-Lymphozyten in vitro generiert. Hierzu wurden in einem ersten Schritt naive T-Lymphozyten aus den peripheren mononukleären Zellen isoliert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 27 und 28 dargestellt.

	Anzahl n=	Mittelwert \pm SD in %	Median	Min-Max in %
CD4+	6	97,38 \pm 1,44	97,90	94,79 - 98,58
CD45RA+CD27+	6	95,90 \pm 5,03	98,13	86,90 - 99,60

Tab. 27: Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen vor Treg-Induktion bei den Kindern

	Anzahl n=	Mittelwert \pm SD in %	Median	Min-Max in %
CD4+	4	96,96 \pm 3,91	98,74	91,11 - 99,26
CD45RA+CD27+	4	97,17 \pm 2,56	97,16	94,61 - 99,74

Tab. 28: Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen vor Treg-Induktion bei den Erwachsenen

3.2.2 Auswertung der Reinheit der CD25+ T-Lymphozyten nach Induktion und MACS Isolation vor Suppression

Aus den selektierten naiven T-Lymphozyten wurden wie in Kap. 2.7.2 beschrieben CD25 positive T-Lymphozyten induziert. Diese CD25 positiven T-Lymphozyten wurden in einem weiteren Schritt vor den Suppressionsversuchen isoliert. In Tabelle 29 sind die Ergebnisse dargestellt.

	Anzahl n=	Mittelwert \pm SD in %	Median	Min-Max in %
Erwachsene CD25+	4	96,02 \pm 6,27	98,84	86,64 - 99,76
Kinder CD25+	6	98,37 \pm 1,13	98,88	96,38 - 99,38

Tab. 29: Reinheit der CD25+ T-Zellfraktionen vor Treg-Induktion bei den Erwachsenen und den Kindern

3.2.3 Suppressionsfähigkeit induzierter Tregs

Die Suppressionsfähigkeit der induzierten regulatorischen T-Lymphozyten wurde wie in Kap. 2.7.4 beschrieben getestet. Mit Hilfe der CFSE-Färbung wurde die Proliferationsaktivität geprüft. Es wurden Vergleiche gezogen zwischen einem Versuchsansatz mit proliferierenden Zellen und regulatorischen T-Lymphozyten im Verhältnis 1 zu 1, einem Versuchsansatz mit einem Verhältnis 1 zu 0,5 und einer Kontrollprobe ohne regulatorische T-Lymphozyten.

Um die proliferationshemmenden Eigenschaften der regulatorischen T-Lymphozyten zu bestimmen wurde ein Steigerungsindex (Verhältnis) zwischen der Kontrollprobe und dem Versuchsansatz mit einem Verhältnis der proliferierenden Zellen zu den regulatorischen T-Lymphozyten von 1 zu 1 gebildet. Hierdurch zeigte sich in den jeweiligen Gruppen die Abnahme der Proliferation bei Zugabe von regulatorischen

T-Lymphozyten. Dieses Indizes wurden dann zwischen den Gruppen verglichen. Die graphische Darstellung ist in den Abbildungen 35, 36 und 37 dargestellt. Die Tabelle 42 zeigt die zu Grunde liegenden Daten.

Die in Tab. 41 dargestellten Werte des Versuchsansatzes mit einem Verhältnis der proliferierenden zu den regulatorischen T-Lymphozyten von 1 zu 0,5 wurde als interne Plausibilitätsprüfung der Suppressionsversuche verwendet.

Patientencode	Proliferation			Index	
	1:1	1:0,5	1:0	1:0 / 1:1	1:0 / 1:0,5
E01	41,60 %	49,90 %	54,40 %	1,31	1,09
E02	34,10 %	44,80 %	55,80 %	1,64	1,25
E03	31,20 %	31,90 %	49,40 %	1,58	1,55
E04	37,30 %	39,00 %	80,70 %	2,16	2,07
P01	63,30 %	69,00 %	75,20 %	1,19	1,09
P02	60,70 %	67,40 %	78,30 %	1,29	1,16
P03	35,60 %	41,90 %	56,50 %	1,59	1,35
P04	49,20 %	61,00 %	81,60 %	1,66	1,34
P05	41,70 %	46,80 %	82,70 %	1,98	1,77
P06	12,00 %	10,10 %	18,70 %	1,56	1,85

Tab. 30: Suppressionsassays

	Anzahl n=	Mittelwert ± SD	Median	Min - Max in %
Erwachsene Kontrolle	2	1,48 ± 0,23	1,48	1,31 - 1,64
Erwachsene T1DM	2	1,87 ± 0,41	1,87	1,85 - 2,16
Kinder Kontrolle	2	1,24 ± 0,07	1,24	1,19 - 1,29
Kinder T1DM EM	2	1,63 ± 0,05	1,63	1,59 - 1,66
Kinder Kontrolle	2	1,24 ± 0,07	1,24	1,19 - 1,29
Kinder T1DM LZ	2	1,77 ± 0,30	1,77	1,56 - 1,98

Tab. 31: Suppressionsassays, Vergleich der Index-Werte

In den Boxplots ist zu sehen, dass bei den Gruppen der Diabetiker der Index der Proliferationssteigerung, also die Zunahme der Proliferation im Versuchsansatz ohne regulatorische T-Lymphozyten im Vergleich zum Versuchsansatz mit Tregs, jeweils oberhalb der Indizes der Kontrollgruppen liegt. Auf eine statistische Analyse wurde aufgrund der sehr niedrigen Fallzahlen verzichtet.

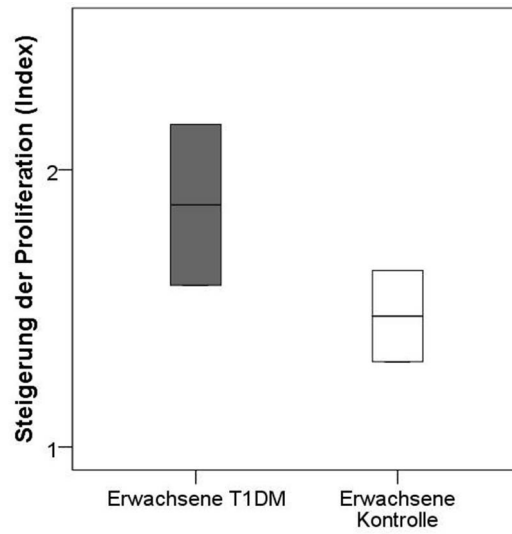


Abb. 35: Steigerung der Proliferation (Index) im Vergleich bei den Erwachsenen

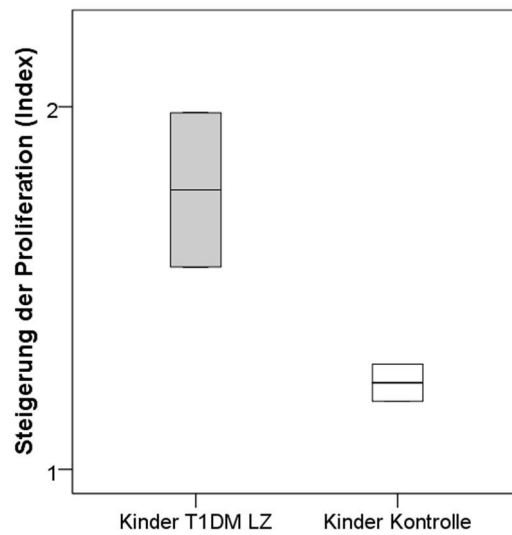


Abb. 36: Steigerung der Proliferation (Index) im Vergleich zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes und den Kontrollpatienten

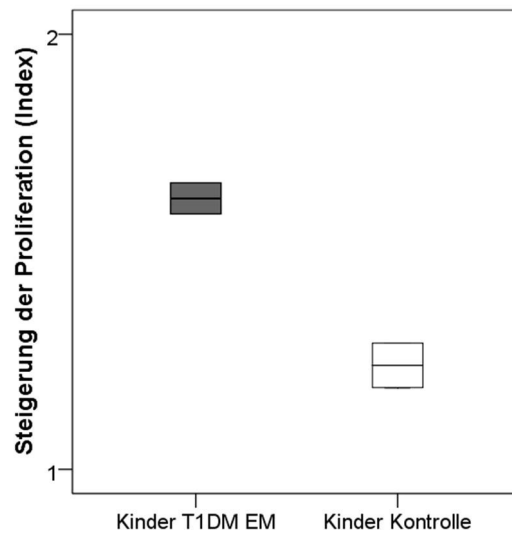


Abb. 37: Steigerung der Proliferation (Index) im Vergleich zwischen den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes und den Kontrollpatienten

3.3 Beeinflussung des T-Zell-Verhaltens durch Einfluss von $TGF\beta$ und Blockade von $IFN\gamma$

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von $TGF\beta$ und der Blockade von $IFN\gamma$ dargestellt.

3.3.1 Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes mellitus

Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 dargestellt.

Verteilung der T-Zell Subpopulationen

Der Einfluss von $TGF\beta$ führte bei den naiven T-Lymphozyten zu signifikant höheren Werten, bei den Memory-T-Lymphozyten zu signifikant niedrigeren Werten und bei den terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Werten. Für die Effektor-T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Die Blockade von $IFN\gamma$ führte zu signifikant höheren Werten bei den naiven T-Lymphozyten. Bei den Memory- und Effektor-T-Lymphozyten zeigten sich signifikant niedrigere Werte und bei den terminal differenzierten T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu niedrigeren Werten.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Es zeigte sich bei Blockade von $\text{IFN}\gamma$ ein Trend zu niedrigeren Ki67-Werten. Der Einfluss von $\text{TGF}\beta$ zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion

Für die IL17-Produktion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ oder die Blockade von $\text{IFN}\gamma$. Für $\text{IFN}\gamma$ zeigten sich bei Blockade von $\text{IFN}\gamma$ und durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ Trends zu niedrigeren Werten. Für die für IL17 und $\text{IFN}\gamma$ doppelt positiven T-Lymphozyten zeigten sich bei Blockade von $\text{IFN}\gamma$ keine signifikanten Unterschiede. Der Einfluss von $\text{TGF}\beta$ erbrachte einen Trend zu niedrigeren Werten.

Für die Ki67+IL17+ Zellen zeigte sich weder durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ noch durch die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ ein signifikanter Unterschied. Für die Ki67+ $\text{IFN}\gamma$ + Zellen zeigte sich durch die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ ein Trend zu niedrigeren Werten. Der Einfluss von $\text{TGF}\beta$ führte zu signifikant niedrigeren Werten. Bei den für IL17 und $\text{IFN}\gamma$ doppelt positiven Ki67+ Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ oder die Blockade von $\text{IFN}\gamma$.

Durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ zeigte sich für die Produktion von IL17 kein signifikanter Unterschied innerhalb der T-Zell-Subpopulationen.

Bei Blockade von $\text{IFN}\gamma$ zeigten sich für die Produktion von IL17 signifikant niedrigere Werte innerhalb der CD45RO-CD27+ und der CD45RO+CD27- T-Lymphozyten. Innerhalb der CD45RO+CD27+ und der CD45RO-CD27- T-Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Für die Expression des $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptors zeigte sich weder durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ noch bei Blockade von $\text{IFN}\gamma$ ein signifikanter Unterschied.

Verhalten der T-Zell Regulation

Für die CD25+FOXP3+ und die CD25+FOXP3+CD127-T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei Blockade von $\text{IFN}\gamma$ oder unter Einfluss von $\text{TGF}\beta$.

Für die IL17-Produktion der CD25+FOXP3+ Zellen zeigte sich durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ oder die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ kein signifikanter Unterschied.

Für die IL10-Produktion der CD25+FOXP3+CD127- Zellen zeigten sich durch die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ signifikant niedrigere Werte. Durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ zeigte sich ein Trend zu höheren Werten.

Für die CD25+FOXP3+CD127-IL17+ Zellen zeigte sich durch den Einfluss von $\text{TGF}\beta$ ein Trend zu höheren Werten. Die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ führte nicht zu signifikanten Unterschieden.

Für die Expression von Ki67 und CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigten sich weder durch den Einfluss von TGF β noch durch die Blockade von IFN γ signifikante Unterschiede.

	TH17/1			TH17/1 + anti-IFN γ			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	3,71 \pm 2,10	4,18	1,10 - 5,78	2,82 \pm 1,59	2,60	0,66 - 5,04	0,138
IFN γ	12,85 \pm 5,28	15,58	7,05 - 17,82	10,09 \pm 3,49	11,91	4,93 - 12,92	0,080
IL17+IFN γ +	1,46 \pm 0,80	1,19	0,48 - 2,46	1,13 \pm 0,60	1,06	0,28 - 1,85	0,223
Ki67+	30,54 \pm 17,42	38,91	8,41 - 49,13	26,13 \pm 14,72	30,40	8,43 - 41,81	0,080
Ki67+IFN γ +	9,29 \pm 5,22	10,98	3,07 - 15,28	6,95 \pm 3,72	7,36	2,12 - 11,38	0,080
Ki67+IL17+	2,12 \pm 1,68	1,93	0,39 - 3,90	1,57 \pm 1,04	1,25	0,37 - 3,17	0,345
Ki67+IL17+IFN γ +	1,16 \pm 0,73	0,90	0,41 - 2,20	1,11 \pm 0,86	0,68	0,18 - 2,19	0,500
CD45RO-CD27+	61,94 \pm 15,20	58,37	42,20 - 82,08	66,72 \pm 15,58	61,54	46,72 - 86,15	0,043
CD45RO-CD27+IL17+	1,10 \pm 0,72	1,19	0,15 - 1,99	0,71 \pm 0,53	0,63	0,07 - 1,55	0,043
CD45RO+CD27+	30,46 \pm 14,58	33,06	11,28 - 49,51	27,33 \pm 14,99	32,58	9,05 - 46,66	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	2,00 \pm 1,34	2,34	0,55 - 3,31	1,80 \pm 1,14	1,78	0,29 - 3,51	0,500
CD45RO+CD27-	4,71 \pm 1,08	5,17	3,52 - 5,95	3,66 \pm 0,90	4,21	2,30 - 4,37	0,043
CD45RO+CD27-IL17+	0,66 \pm 0,28	0,68	0,34 - 1,08	0,46 \pm 0,20	0,43	0,23 - 0,74	0,043
CD45RO-CD27-	2,89 \pm 1,13	2,62	1,93 - 4,77	2,30 \pm 0,74	2,23	1,62 - 3,44	0,080
CD45RO-CD27-IL17+	0,23 \pm 0,06	0,20	0,18 - 0,32	0,19 \pm 0,08	0,22	0,11 - 0,28	0,225
CD25+FOXP3+	42,87 \pm 11,01	47,54	27,63 - 53,72	38,83 \pm 11,65	44,82	21,10 - 49,86	0,138
CD25+FOXP3+CD127-	32,85 \pm 9,82	37,26	21,69 - 41,47	28,45 \pm 9,81	28,14	16,35 - 42,88	0,225
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,66 \pm 1,09	0,21	0,03 - 2,60	0,15 \pm 0,18	0,07	0,02 - 0,47	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,78 \pm 1,15	2,00	0,49 - 3,39	1,15 \pm 1,37	0,41	0,22 - 3,47	0,225
CD25+FOXP3+IL10+	1,47 \pm 2,31	0,54	0,19 - 5,57	1,05 \pm 1,65	0,34	0,24 - 4,00	0,144
CD25+FOXP3+IL17+	2,44 \pm 2,16	2,03	0,62 - 6,07	2,45 \pm 1,72	1,96	1,14 - 5,31	0,893
CD25+FOXP3+CD62L+	6,38 \pm 6,46	2,93	1,90 - 17,35	6,26 \pm 6,93	2,75	1,97 - 18,43	0,893
CD25+FOXP3+Ki67+	25,66 \pm 14,07	29,25	8,42 - 41,87	24,02 \pm 12,20	28,84	7,98 - 36,24	0,345
IFN γ R+	7,22 \pm 5,72	9,07	1,34 - 14,39	6,67 \pm 4,50	5,25	1,77 - 12,19	0,500

	TH17/1			TH17/1 + TGF β			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	3,71 \pm 2,10	4,18	1,10 - 5,78	2,55 \pm 0,96	2,39	1,29 - 3,73	0,225
IFN γ	12,85 \pm 5,28	15,58	7,05 - 17,82	4,48 \pm 1,88	4,04	2,53 - 7,61	0,080
IL17+IFN γ +	1,46 \pm 0,80	1,19	0,48 - 2,46	0,76 \pm 0,43	0,81	0,27 - 1,31	0,080
Ki67+	30,54 \pm 17,42	38,91	8,41 - 49,13	28,00 \pm 17,64	24,60	7,56 - 55,47	0,500
Ki67+IFN γ +	9,29 \pm 5,22	10,98	3,07 - 15,28	2,03 \pm 0,41	1,97	1,44 - 2,46	0,043
Ki67+IL17+	2,12 \pm 1,68	1,93	0,39 - 3,90	1,34 \pm 0,63	1,27	0,74 - 2,29	0,225
Ki67+IL17+IFN γ +	1,16 \pm 0,73	0,90	0,41 - 2,20	0,61 \pm 0,41	0,53	0,22 - 1,19	0,225
CD45RO-CD27+	61,94 \pm 15,20	58,37	42,20 - 82,08	68,01 \pm 11,68	65,51	53,65 - 83,58	0,043
CD45RO-CD27+IL17+	1,10 \pm 0,72	1,19	0,15 - 1,99	0,76 \pm 0,34	0,97	0,31 - 1,07	0,225
CD45RO+CD27+	30,46 \pm 14,58	33,06	11,28 - 49,51	24,39 \pm 11,82	27,58	6,63 - 38,95	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	2,00 \pm 1,34	2,34	0,55 - 3,31	1,40 \pm 0,92	0,85	0,60 - 2,59	0,686
CD45RO+CD27-	4,71 \pm 1,08	5,17	3,52 - 5,95	4,11 \pm 1,33	4,09	2,36 - 5,71	0,500
CD45RO+CD27-IL17+	0,66 \pm 0,28	0,68	0,34 - 1,08	0,61 \pm 0,22	0,57	0,32 - 0,83	0,496
CD45RO-CD27-	2,89 \pm 1,13	2,62	1,93 - 4,77	3,49 \pm 1,92	4,06	1,15 - 5,69	0,686
CD45RO-CD27-IL17+	0,23 \pm 0,06	0,20	0,18 - 0,32	0,20 \pm 0,11	0,16	0,09 - 0,34	0,345
CD25+FOXP3+	42,87 \pm 11,01	47,54	27,63 - 53,72	44,35 \pm 12,54	45,55	27,64 - 62,18	0,686
CD25+FOXP3+CD127-	32,85 \pm 9,82	37,26	21,69 - 41,47	36,61 \pm 13,53	33,50	21,96 - 58,70	0,500
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,66 \pm 1,09	0,21	0,03 - 2,60	0,75 \pm 1,15	0,22	0,08 - 2,79	0,068
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,78 \pm 1,15	2,00	0,49 - 3,39	2,57 \pm 1,74	1,99	0,61 - 4,83	0,080
CD25+FOXP3+IL10+	1,47 \pm 2,31	0,54	0,19 - 5,57	1,49 \pm 1,94	0,80	0,42 - 4,95	0,498
CD25+FOXP3+IL17+	2,44 \pm 2,16	2,03	0,62 - 6,07	3,12 \pm 2,83	1,31	1,06 - 7,52	0,893
CD25+FOXP3+CD62L+	6,38 \pm 6,46	2,93	1,90 - 17,35	6,01 \pm 9,92	1,42	0,98 - 23,69	0,500
CD25+FOXP3+Ki67+	25,66 \pm 14,07	29,25	8,42 - 41,87	28,79 \pm 16,30	32,08	7,92 - 51,43	0,225
IFN γ R+	7,22 \pm 5,72	9,07	1,34 - 14,39	8,88 \pm 6,84	9,45	2,26 - 19,34	0,686

Tab. 32: Darstellung der Ergebnisse der Zellkultur im Vergleich zu den Ergebnissen unter IFN γ -Blockade und TGF β -Einfluss bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

3.3.2 Kinder mit einem länger bestehendem Diabetes Diabetes mellitus

Verteilung der T-Zell Subpopulationen

Bezüglich der T-Zell-Subpopulationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied durch den Einfluss von $TGF\beta$ oder die Blockade von $IFN\gamma$.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede durch den Einfluss von $TGF\beta$ oder durch die Blockade von $IFN\gamma$ bezüglich der proliferativen Aktivität.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion

Für IL17- und $IFN\gamma$ -Produktion sowie für die für IL17 und $IFN\gamma$ doppelt positiven T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede durch den Einfluss von $TGF\beta$ oder die Blockade von $IFN\gamma$.

Ebenfalls zeigten sich für die IL17+, die $IFN\gamma$ + und die für IL17 und $IFN\gamma$ doppelt positiven Ki67+ Zellen keine signifikanten Unterschiede durch den Einfluss von $TGF\beta$ oder die Blockade von $IFN\gamma$.

Für die IL17-Produktion innerhalb der T-Zell-Subpopulationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied durch den Einfluss von $TGF\beta$ oder die Blockade von $IFN\gamma$.

Für die Expression des $IFN\gamma$ -Rezeptors zeigten sich sowohl bei Blockade von $IFN\gamma$ als auch bei Einfluss durch $TGF\beta$ signifikant höhere Werte.

Verhalten der T-Zell Regulation

Für die CD25+FOXP3+ und die CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten zeigten sich sowohl bei Blockade von $IFN\gamma$ als auch unter Einfluss durch $TGF\beta$ signifikant höhere Werte.

Für die IL17-Produktion der CD25+FOXP3+ Zellen zeigten sich weder durch den Einfluss von $TGF\beta$ noch durch die Blockade von $IFN\gamma$ signifikante Unterschiede.

Für die IL10-Produktion der CD25+FOXP3+CD127- Zellen zeigten sich durch den Einfluss von $TGF\beta$ oder die Blockade von $IFN\gamma$ keine signifikanten Unterschiede. Für die IL17-Produktion zeigten sich hingegen durch den Einfluss von $TGF\beta$ und die Blockade von $IFN\gamma$ signifikant höhere Werte.

Für die Expression von Ki67 und CD62L auf CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten zeigten sich weder durch den Einfluss von $TGF\beta$ noch durch die Blockade von

IFN γ signifikante Unterschiede.

	TH17/1			TH17/1 + anti-IFN γ			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	2,08 \pm 1,61	1,88	0,36 - 4,72	2,44 \pm 2,85	1,06	0,80 - 7,45	0,686
IFN γ	3,98 \pm 1,19	3,96	2,81 - 5,63	4,78 \pm 4,11	3,17	1,87 - 11,98	0,500
IL17+IFN γ +	0,51 \pm 0,31	0,54	0,07 - 0,83	1,62 \pm 2,76	0,52	0,20 - 6,55	0,686
Ki67+	13,36 \pm 6,93	17,21	4,73 - 20,29	11,38 \pm 3,61	11,25	6,95 - 16,53	0,500
Ki67+IFN γ +	1,99 \pm 0,92	1,44	1,31 - 3,40	1,94 \pm 1,73	1,39	0,88 - 5,00	0,500
Ki67+IL17+	1,27 \pm 0,94	1,24	0,10 - 2,19	1,26 \pm 1,23	0,82	0,27 - 3,29	0,686
Ki67+IL17+IFN γ +	0,31 \pm 0,20	0,31	0,01 - 0,52	0,72 \pm 1,20	0,21	0,12 - 2,87	0,893
CD45RO-CD27+	72,12 \pm 7,21	72,57	64,46 - 81,24	75,98 \pm 6,23	74,57	68,91 - 85,07	0,225
CD45RO-CD27+IL17+	0,94 \pm 0,91	0,67	0,16 - 2,51	1,39 \pm 1,92	0,49	0,23 - 4,76	0,893
CD45RO+CD27+	21,16 \pm 5,75	21,09	15,32 - 27,42	17,37 \pm 4,43	18,18	10,59 - 22,72	0,225
CD45RO+CD27+IL17+	1,03 \pm 0,71	1,08	0,17 - 2,00	0,80 \pm 0,58	0,7	0,31 - 1,73	0,500
CD45RO+CD27-	3,61 \pm 1,93	4,11	1,31 - 5,53	3,69 \pm 2,22	4,36	1,00 - 5,88	0,893
CD45RO+CD27-IL17+	0,21 \pm 0,11	0,23	0,05 - 0,34	0,37 \pm 0,42	0,21	0,05 - 1,11	0,715
CD45RO-CD27-	3,11 \pm 1,39	2,55	1,57 - 5,04	2,96 \pm 1,08	3,15	1,25 - 4,21	0,893
CD45RO-CD27-IL17+	0,16 \pm 0,15	0,13	0,05 - 0,42	0,16 \pm 0,16	0,09	0,02 - 0,36	0,500
CD25+FOXP3+	20,94 \pm 5,31	20,33	13,09 - 27,42	23,47 \pm 4,95	24,58	15,22 - 28,52	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	13,72 \pm 6,35	11,21	6,19 - 21,53	16,02 \pm 5,33	17,78	8,54 - 21,55	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,07 \pm 0,06	0,03	0,01 - 0,14	0,09 \pm 0,13	0,06	0,00 - 0,31	0,892
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,31 \pm 0,26	0,38	0,03 - 0,59	0,55 \pm 0,45	0,77	0,06 - 1,01	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,49 \pm 0,75	0,29	0,02 - 1,81	0,24 \pm 0,22	0,25	0,02 - 0,58	1,000
CD25+FOXP3+IL17+	2,18 \pm 2,27	1,82	0,27 - 5,91	1,89 \pm 1,37	2,41	0,41 - 3,57	0,893
CD25+FOXP3+CD62L+	5,90 \pm 2,14	5,29	3,62 - 9,39	6,29 \pm 2,42	6,09	3,47 - 9,39	0,893
CD25+FOXP3+Ki67+	7,55 \pm 5,18	5,54	2,83 - 13,81	7,62 \pm 3,80	7,17	4,12 - 13,72	0,893
IFN γ R+	2,63 \pm 2,11	1,22	0,87 - 5,04	7,61 \pm 5,89	5,69	1,41 - 15,10	0,043

	TH17/1			TH17/1 + TGF β			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	2,08 \pm 1,61	1,88	0,36 - 4,72	1,54 \pm 1,20	1,24	0,41 - 3,50	0,343
IFN γ	3,98 \pm 1,19	3,96	2,81 - 5,63	3,06 \pm 1,14	3,41	1,20 - 4,05	0,416
IL17+IFN γ +	0,51 \pm 0,31	0,54	0,07 - 0,83	0,55 \pm 0,62	0,19	0,07 - 1,43	0,686
Ki67+	13,36 \pm 6,93	17,21	4,73 - 20,29	14,62 \pm 8,48	13,03	7,10 - 28,51	0,500
Ki67+IFN γ +	1,99 \pm 0,92	1,44	1,31 - 3,40	1,41 \pm 0,88	1,22	0,24 - 2,55	0,225
Ki67+IL17+	1,27 \pm 0,94	1,24	0,10 - 2,19	0,81 \pm 0,83	0,41	0,25 - 2,26	0,345
Ki67+IL17+IFN γ +	0,31 \pm 0,20	0,31	0,01 - 0,52	0,29 \pm 0,31	0,12	0,03 - 0,71	0,686
CD45RO-CD27+	72,12 \pm 7,21	72,57	64,46 - 81,24	72,37 \pm 5,04	71,48	66,93 - 80,65	1,000
CD45RO-CD27+IL17+	0,94 \pm 0,91	0,67	0,16 - 2,51	0,69 \pm 0,57	0,37	0,15 - 1,43	0,345
CD45RO+CD27+	21,16 \pm 5,75	21,09	15,32 - 27,42	20,33 \pm 4,64	19,31	16,40 - 27,57	0,893
CD45RO+CD27+IL17+	1,03 \pm 0,71	1,08	0,17 - 2,00	0,62 \pm 0,58	0,43	0,26 - 1,65	0,138
CD45RO+CD27-	3,61 \pm 1,93	4,11	1,31 - 5,53	4,13 \pm 2,72	4,66	1,50 - 8,14	0,686
CD45RO+CD27-IL17+	0,21 \pm 0,11	0,23	0,05 - 0,34	0,22 \pm 0,15	0,17	0,09 - 0,40	0,686
CD45RO-CD27-	3,11 \pm 1,39	2,55	1,57 - 5,04	3,17 \pm 1,13	3,84	1,45 - 4,09	0,893
CD45RO-CD27-IL17+	0,16 \pm 0,15	0,13	0,05 - 0,42	0,12 \pm 0,08	0,07	0,04 - 0,22	0,345
CD25+FOXP3+	20,94 \pm 5,31	20,33	13,09 - 27,42	28,72 \pm 8,63	30,32	15,53 - 38,58	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	13,72 \pm 6,35	11,21	6,19 - 21,53	20,65 \pm 7,04	23,45	13,09 - 28,53	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,07 \pm 0,06	0,03	0,01 - 0,14	0,19 \pm 0,19	0,2	0,01 - 0,46	0,144
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,31 \pm 0,26	0,38	0,03 - 0,59	1,10 \pm 1,08	1,01	0,06 - 2,69	0,043
CD25+FOXP3+IL10+	0,49 \pm 0,75	0,29	0,02 - 1,81	0,68 \pm 0,62	0,82	0,03 - 1,36	0,343
CD25+FOXP3+IL17+	2,18 \pm 2,27	1,82	0,27 - 5,91	1,70 \pm 1,76	0,76	0,31 - 4,33	0,686
CD25+FOXP3+CD62L+	5,90 \pm 2,14	5,29	3,62 - 9,39	7,06 \pm 2,26	6,03	5,11 - 10,38	0,893
CD25+FOXP3+Ki67+	7,55 \pm 5,18	5,54	2,83 - 13,81	7,63 \pm 2,70	7,3	3,83 - 11,23	0,893
IFN γ R+	2,63 \pm 2,11	1,22	0,87 - 5,04	12,70 \pm 10,90	6,56	5,57 - 31,01	0,043

Tab. 33: Darstellung der Ergebnisse der Zellkultur im Vergleich zu den Ergebnissen unter IFN γ -Blockade und TGF β -Einfluss bei den Kindern mit einem länger bestehendem Diabetes. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

3.3.3 Erwachsene Diabetiker

Verteilung der T-Zell Subpopulationen

Der Einfluss von TGF β führte zu signifikant höheren Werten für die naiven und die terminal differenzierten T-Lymphozyten sowie zu signifikant niedrigeren Werten bei den Memory T-Lymphozyten. Für die Effektor-T-Lymphozyten zeigte sich ein Trend zu höheren Werten.

Die Blockade von IFN γ führte zu signifikant höheren Werten für die naiven T-Lymphozyten und zu signifikant niedrigeren Werten bei den Memory- und terminal differenzierten T-Lymphozyten. Bei den Effektor-T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Proliferative Aktivität der T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Der Einfluss von TGF β zeigte einen Trend zu niedrigeren Ki67-Werten. Die Blockade von IFN γ erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Ausfall der proinflammatorischen Reaktion

Für IL17 zeigten sich durch den Einfluss von TGF β keine signifikanten Unterschiede, für IFN γ zeigten sich signifikant niedrigere Werte. Für IL17 zeigten sich bei Blockade von IFN γ keine signifikanten Unterschiede, für IFN γ zeigte sich ein Trend zu niedrigeren Werten.

Für die für IL17 und IFN γ doppelt positiven T-Lymphozyten zeigten sich weder durch den Einfluss von TGF β noch durch die Blockade von IFN γ signifikante Unterschiede.

Für die Ki67+IL17+ Zellen zeigten sich durch den Einfluss von TGF β signifikant höhere Werte, für die Ki67+IFN γ + Zellen signifikant niedrigere Werte. Die Blockade von IFN γ erbrachte für die Ki67+IL17+ und die Ki67+IFN γ + Zellen keine signifikanten Unterschiede. Bei den für IL17 und IFN γ doppelt positiven Ki67+ Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede durch den Einfluss von TGF β oder die Blockade von IFN γ .

Für die CD45RO-CD27+IL17+ und CD45RO+CD27+IL17+ Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied durch den Einfluss von TGF β oder die Blockade von IFN γ . Für die CD45RO+CD27-IL17+ und die CD45RO-CD27-IL17+ Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied durch die Blockade von IFN γ . Bei Einfluss von TGF β zeigte sich für die CD45RO+CD27-IL17+ Zellen ein Trend zu höheren Werten.

Für die Expression des IFN γ -Rezeptors zeigte sich bei Blockade von IFN γ und unter Einfluss von TGF β ein Trend zu höheren Werten.

Verhalten der T-Zell Regulation

Es zeigten sich für die CD25+FOXP3+ T-Lymphozyten bei Blockade von IFN γ und unter Einfluss von TGF β signifikant niedrigere Werte.

Für die CD25+FOXP3+CD127- T-Lymphozyten zeigten sich durch die Blockade von IFN γ signifikant niedrigere Werte. Der Einfluss von TGF β erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Für die CD25+FOXP3+IL17+ Zellen zeigten sich durch den Einfluss von TGF β signifikant niedrigere Werte. Die IFN γ -Blockade erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Für die IL10- und IL17-Produktion der CD25+FOXP3+CD127- Zellen zeigten sich weder durch die Blockade von IFN γ noch durch den Einfluss von TGF β signifikante Unterschiede.

Für die CD25+FOXP3+Ki67+ Zellen zeigten sich durch die Blockade von IFN γ signifikant höhere Werte. Der Einfluss von TGF β erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Für die CD25+FOXP3+CD62L+ Zellen zeigten sich durch den Einfluss von TGF β signifikant niedrigere Werte. Die Blockade von IFN γ erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

	TH17/1			TH17/1 + anti-IFN γ			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	3,01 \pm 0,79	3,14	2,14 - 3,99	3,35 \pm 1,57	2,79	1,67 - 5,71	0,686
IFNγ	15,36 \pm 7,09	18,26	6,95 - 21,85	13,52 \pm 8,03	18,52	4,13 - 19,81	0,080
IL17+IFNγ+	1,30 \pm 0,49	1,24	0,84 - 2,11	1,38 \pm 0,58	1,55	0,67 - 2,00	0,893
Ki67+	23,12 \pm 22,82	22,86	0,84 - 58,21	22,57 \pm 23,36	19,73	1,93 - 57,95	0,500
Ki67+IFNγ+	7,65 \pm 6,38	9,04	0,35 - 15,60	7,32 \pm 6,88	7,98	0,39 - 16,25	0,686
Ki67+IL17+	1,17 \pm 0,89	1,58	0,10 - 2,18	1,73 \pm 1,60	1,87	0,20 - 4,06	0,138
Ki67+IL17+IFNγ+	0,78 \pm 0,60	0,56	0,10 - 1,53	0,97 \pm 0,78	1,17	0,18 - 2,01	0,500
CD45RO-CD27+	46,08 \pm 17,13	38,04	26,83 - 67,81	51,59 \pm 19,01	44,07	29,05 - 74,16	0,043
CD45RO-CD27+IL17+	0,44 \pm 0,53	0,19	0,07 - 1,33	0,45 \pm 0,46	0,4	0,08 - 1,21	1,000
CD45RO+CD27+	41,97 \pm 18,96	49,68	13,21 - 60,75	36,84 \pm 18,23	43,14	10,47 - 54,91	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	1,40 \pm 0,71	1,4	0,50 - 2,12	1,40 \pm 0,84	1,35	0,26 - 2,57	0,893
CD45RO+CD27-	8,57 \pm 3,43	10	3,13 - 11,33	8,56 \pm 4,47	8,4	2,61 - 14,80	0,686
CD45RO+CD27-IL17+	1,08 \pm 0,75	0,62	0,43 - 1,91	1,45 \pm 1,37	0,72	0,29 - 3,44	0,345
CD45RO-CD27-	3,38 \pm 2,55	2,67	1,33 - 7,65	3,01 \pm 2,30	2,63	1,23 - 6,97	0,043
CD45RO-CD27-IL17+	0,25 \pm 0,24	0,14	0,03 - 0,65	0,18 \pm 0,16	0,12	0,07 - 0,46	0,225
CD25+FOXP3+	44,91 \pm 24,45	56,67	8,22 - 69,34	40,80 \pm 24,03	50,95	6,08 - 67,43	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	34,70 \pm 19,92	40,76	5,89 - 59,17	31,12 \pm 18,41	36,57	4,69 - 53,91	0,043
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,12 \pm 0,09	0,09	0,00 - 0,23	0,27 \pm 0,34	0,18	0,00 - 0,86	0,144
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,56 \pm 1,07	1,47	0,15 - 2,76	1,64 \pm 1,56	0,85	0,09 - 3,50	0,893
CD25+FOXP3+IL10+	0,39 \pm 0,27	0,36	0,10 - 0,82	0,65 \pm 0,77	0,52	0,02 - 1,97	0,893
CD25+FOXP3+IL17+	1,90 \pm 1,37	2,05	0,23 - 3,59	2,38 \pm 2,52	1,28	0,24 - 6,57	0,345
CD25+FOXP3+CD62L+	4,85 \pm 3,10	4,68	0,23 - 8,36	4,90 \pm 2,75	5,75	0,17 - 7,22	0,892
CD25+FOXP3+Ki67+	15,24 \pm 20,81	8,50	0,00 - 51,03	17,65 \pm 22,25	11,79	0,06 - 55,44	0,043
IFNγR+	2,59 \pm 1,14	1,84	1,77 - 4,34	4,92 \pm 1,93	5,00	2,38 - 7,44	0,080

	TH17/1			TH17/1 + TGF β			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max	
IL17+	3,01 \pm 0,79	3,14	2,14 - 3,99	4,18 \pm 1,99	4,57	1,34 - 6,17	0,104
IFNγ	15,36 \pm 7,09	18,26	6,95 - 21,85	8,23 \pm 2,33	8,75	4,57 - 10,33	0,043
IL17+IFNγ+	1,30 \pm 0,49	1,24	0,84 - 2,11	1,45 \pm 0,48	1,33	0,90 - 2,20	0,345
Ki67+	23,12 \pm 22,82	22,86	0,84 - 58,21	20,84 \pm 22,17	21,17	1,41 - 56,52	0,080
Ki67+IFNγ+	7,65 \pm 6,38	9,04	0,35 - 15,60	2,73 \pm 2,19	2,86	0,31 - 6,09	0,043

Ki67+IL17+	1,17 ± 0,89	1,58	0,10 - 2,18	1,85 ± 1,65	1,76	0,20 - 4,37	0,043
Ki67+IL17+IFN γ +	0,78 ± 0,60	0,56	0,10 - 1,53	0,80 ± 0,43	0,95	0,15 - 1,21	0,786
CD45RO-CD27+	46,08 ± 17,13	38,04	26,83 - 67,81	51,02 ± 15,91	48,1	28,02 - 70,00	0,043
CD45RO-CD27+IL17+	0,44 ± 0,53	0,19	0,07 - 1,33	0,53 ± 0,67	0,21	0,18 - 1,73	0,345
CD45RO+CD27+	41,97 ± 18,96	49,68	13,21 - 60,75	26,32 ± 10,12	29,65	10,21 - 35,24	0,043
CD45RO+CD27+IL17+	1,40 ± 0,71	1,4	0,50 - 2,12	1,38 ± 0,72	1,5	0,18 - 2,09	0,893
CD45RO+CD27-	8,57 ± 3,43	10	3,13 - 11,33	16,81 ± 9,94	12,94	8,89 - 33,72	0,080
CD45RO+CD27-IL17+	1,08 ± 0,75	0,62	0,43 - 1,91	2,16 ± 1,59	1,64	0,53 - 4,15	0,080
CD45RO-CD27-	3,38 ± 2,55	2,67	1,33 - 7,65	5,85 ± 1,79	4,99	4,08 - 8,56	0,043
CD45RO-CD27-IL17+	0,25 ± 0,24	0,14	0,03 - 0,65	0,25 ± 0,15	0,23	0,09 - 0,48	0,686
CD25+FOXP3+	44,91 ± 24,45	56,67	8,22 - 69,34	39,23 ± 24,23	43,46	2,87 - 68,20	0,043
CD25+FOXP3+CD127-	34,70 ± 19,92	40,76	5,89 - 59,17	32,83 ± 22,00	32,95	1,61 - 61,89	0,686
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,12 ± 0,09	0,09	0,00 - 0,23	0,13 ± 0,13	0,10	0,00 - 0,35	1,000
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,56 ± 1,07	1,47	0,15 - 2,76	1,72 ± 1,44	1,31	0,06 - 3,42	0,686
CD25+FOXP3+IL10+	0,39 ± 0,27	0,36	0,10 - 0,82	0,38 ± 0,28	0,33	0,06 - 0,69	0,893
CD25+FOXP3+IL17+	1,90 ± 1,37	2,05	0,23 - 3,59	2,90 ± 2,04	4,31	0,40 - 4,52	0,043
CD25+FOXP3+CD62L+	4,85 ± 3,10	4,68	0,23 - 8,36	2,31 ± 1,27	2,86	0,19 - 3,31	0,043
CD25+FOXP3+Ki67+	15,24 ± 20,81	8,50	0,00 - 51,03	16,77 ± 18,98	16,82	0,03 - 46,98	0,686
IFN γ R+	2,59 ± 1,14	1,84	1,77 - 4,34	10,46 ± 5,13	11,81	1,59 - 14,35	0,080

Tab. 34: Darstellung der Ergebnisse der Zellkultur im Vergleich zu den Ergebnissen unter IFN γ -Blockade und TGF β -Einfluss bei den erwachsenen Diabetikern. Die Werte für Mittelwert \pm SD, Median und Min-Max sind in Prozent angegeben. SD=Standardabweichung, Min=Minimum, Max=Maximum, VA=Versuchsansatz

4 Diskussion

4.1 Stimulationsversuche

Zentrales Thema der Promotionsarbeit ist die Erforschung grundlegender quantitativer und qualitativer Eigenschaften von T-Lymphozyten von Typ 1 Diabetikern mit Erstmanifestation der Erkrankung und länger bestehendem Typ 1 Diabetes im Vergleich zu gesunden, altersentsprechenden Kontrollpersonen. Der Fokus der Arbeit liegt dabei auf der Analyse von naiven T-Lymphozyten und ihrer Polarisierbarkeit in proinflammatorische TH17-Zellen und regulatorische T-Lymphozyten (Tregs), die die Inflammation unterdrücken können. Der Einfluss proinflammatorischer T-Lymphozyten und deren Regulierung in der Entstehung des Diabetes soll in dieser Arbeit durch Simulation einer das Immunsystem stimulierenden Situation im Vergleich zwischen Diabetikern und gesunden Kontrollpatienten untersucht werden.

4.1.1 Wie stellt sich die Verteilung der naiven, Memory-, Effektor- und terminalen T-Lymphozyten nach Stimulation dar und welche Unterschiede finden sich zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?

Es zeigte sich zwischen den Gruppen kein Unterschied in der Verteilung bei unspezifischer Stimulation. Bei spezifischer Stimulation wiesen die länger an Diabetes erkrankten Probanden mehr Effektor-T-Zellen und die Erwachsenen zusätzlich mehr Memory- und weniger Naive-T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollpatienten auf.

Der Einfluss des Reifestadiums der T-Zellen wurde in der Vergangenheit bereits vielfach untersucht und führte zu kontroversen Berichten [97]. *Smerdon et al.* berichteten über eine gesteigerte Expression von CD45RA als Phänotyp naiver T-Zellen bei Patienten mit einer Erstmanifestation eines Diabetes und einer reduzierten CD45RA Expression bei länger an Diabetes erkrankten Menschen [114].

Hofer et. al. berichteten 2009 über einen verminderten Anteil CD4+CD45RA+ T-Zellen bei Erstmanifestationen und einen tendenziell geringer ausgeprägten naiven T-Zell Typ bei langfristig an Diabetes erkrankten Patienten [51]. *Hedman et. al.* wiederum konnten in ihren Versuchen keine Unterschiede bezüglich der CD45RA Expression zwischen Diabetikern und gesunden Kontrollen feststellen [47].

Die unspezifische Stimulation mit aCD3/aCD28 stellt einen starken Stimulus aller vorhandenen T-Lymphozyten dar und führt zu einer generellen Aktivierung der T-Lymphozyten [121, 95]. Möglicherweise werden Unterschiede in der Immunantwort zwischen Diabetikern und gesunden Patienten aufgrund dieser starken Aktivierung überdeckt. Zur Überprüfung dieser Hypothese und um die Annäherung an ein in vivo bestehendes System zu vergrößern wurden Testungen mit dem *C. albicans*-Antigen als spezifischen Stimulus durchgeführt. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten mit einer in der Breite geringeren Immunantwort. *C. albicans* ist ein Stimulus, der als Antigen eine Immunreaktion der immunkompetenten Zellen des menschlichen Organismus auslöst und bei Differenzen zwischen Diabetikern und gesunden Kontrollpatienten Hinweise auf eine generelle Störung der T-Zell-Regulation liefern kann, im Gegensatz zu Diabetes spezifischen Antigenen wie bspw. GAD65, bei denen eine entsprechende Vergleichsreaktion bei gesunden Probanden ausbleiben sollte [73].

Die spezifische Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen führte in allen Gruppen zu einer geringeren Anzahl an Memory-T-Zellen und Anteilig mehr Naiven-T-Zellen. Die Ergebnisse spiegeln die Erwartungen wieder, dass die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen eine deutlich geringere Immunreaktion auslöst als die unspezifische Stimulation mit aCD3/aCD28 und deshalb die T-Zell-Reifung der naiven T-Zellen zu Memory-T-Zellen schwächer verläuft. Diese Feststellung bei spezifischer Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen beschrieben auch *Rosenzweig et. al.* 2013 [99].

4.1.2 Zeigen sich Unterschiede in der proinflammatorischen Antwort (charakterisiert durch die Produktion von IL17 und IFN γ) zwischen den Gruppen in Folge der Stimulation?

Bei den Kindern mit einer Erstmanifestation zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollpatienten eine stärkere IFN γ -Produktion durch die proliferierenden Zellen bei

unspezifischer Stimulation. Ebenfalls zeigten die erwachsenen Diabetiker unter spezifischer Stimulation eine stärkere IFN γ -Synthese innerhalb der proliferierenden T-Zellen als die Kontrollprobanden.

Eine Beteiligung von IFN γ in der Entstehung des Diabetes mellitus Typ ist vielfach beschrieben. *Wang et. al.* konnten 1997 zeigen, dass Mutationen, die zu einer fehlerhaften Expression des IFN γ -Rezeptors führten die Entstehung eines spontanen Diabetes in der NOD-Maus verhinderten [129]. *Herrath et. al.* konnten ebenfalls die β -Zell destruierende Wirkung von IFN γ im Mausmodell zeigen [49]. Interessant ist die Tatsache, dass es in dieser Studie zu dieser differentiellen IFN γ -Produktion unter Bedingungen, die eine Polarisierung in TH17-Zellen begünstigen, kam. Für eine mögliche Erklärung sind Ergebnisse von *Zielinski et. al.* zu nennen, die eine Produktion von IFN γ durch TH17-Zellen beschrieben. Allerdings beschrieben *Zielinski et. al.* diese IFN γ -Produktion innerhalb für *C. albicans* spezifischer T-Lymphozyten [144]. Hieran lässt sich die Plastizität des TH17-Zell-Systems gut demonstrieren.

Im Vergleich zeigte sich bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen eine schwächere IFN γ -Produktion in allen Gruppen. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine verstärkte Reaktion der IL17-Produktion. Dies spiegelt die Bedeutung des TH17-Systems für die Bekämpfung von *C. albicans*-Infektionen wider, entsprechend Beschreibungen von *Puel et. al.* und *Conti et. al.* [90, 27]. Weiterhin erklärt sich die geringere IFN γ -Produktion aufgrund der schwächeren Stimulationspotenz des spezifisch stimulierenden *C. albicans*-Antigen im Vergleich zur unspezifischen Stimulation aller naiven T-Zellen durch aCD3/aCD28. Dies zeigte sich ebenfalls in der Verteilung der T-Zell-Subpopulationen. Hier zeigte sich unter spezifischer Stimulation eine verminderte T-Zell Reifung mit höheren Anteilen von naiven T-Zellen (siehe Kap. 4.1.1).

Die Patienten mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes (sowohl Kinder als auch Erwachsene) zeigten bei unspezifischer Stimulation der naiven T-Zellen genauso wie die an Diabetes erkrankten Kinder (sowohl die Kinder mit einer Erstmanifestation als auch die länger erkrankten) bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der IFN γ -Produktion im Vergleich zu den Kontrollpatienten. Die Betrachtung von Median und Mittelwert zeigte allerdings bei den erwachsenen Diabetikern höhere IFN γ -Spiegel im Vergleich zu den Kontrollen.

Es konnten Unterschiede in der IFN γ -Antwort auch unter spezifischer Stimulation festgestellt werden. In Zusammenhang mit der bereits diskutierten, geringeren Stimulationspotenz des *C. albicans*-Antigens lässt sich möglicherweise aufgrund

der geringen Fallzahl keine Signifikanz darstellen, so dass größere Fallzahlen in weiteren Studien zur Klärung notwendig sind.

Direkte Veränderungen innerhalb der IL17 produzierenden Zellen wie sie bspw. *Marwaha et. al.* im Jahr 2010 beschrieben haben, konnten in dieser Studie bei den Kindern mit einer Erstmanifestation bei unspezifischer Stimulation der T-Lymphozyten in der Peripherie nicht gezeigt werden [76]. Bei genauerer Betrachtung der Studien zeigt sich bei *Marwaha et. al.* eine kürzere Stimulationsdauer (72 Stunden) im Vergleich zu dieser Studie. Weiterhin verwendeten die Kollegen CD3/CD28 beschichtete Dynabeads zur unspezifischen Stimulation. Eine spezifische Stimulationsrichtung durch ein vorgegebenes Zytokinmilieu, wie es in dieser Studie zur Stimulation in Richtung TH17-Zellen verwendet wurde, war nicht gegeben. Die Stimulationsdauer von 96 Stunden in dieser Studie wurde gewählt, da sich in Vorversuchen hierbei eine maximale IL17-Produktion bei gleichzeitig hoher Zellviabilität erzielen lies. Eine Verschleierung der durch *Marwaha et. al.* beschriebenen Effekte durch eine eine längere Stimulation im Sinne einer Überstimulation ist möglich und kann die Unterschiede erklären. Gestützt wird diese Überlegung durch Untersuchungen von *Chen et. al.*, die eine maximale Produktion von IL17 nach Stimulation naiver T-Zellen mit aCD3/aCD28 zwischen Tag 2-3 beschrieben und nach 96 Stunden Zellkultur bereits deutlich abnehmende IL17-Konzentration im ELISA nachweisen konnten [24].

Die Stimulation der naiven T-Zellen mit dem *C. albicans*-Antigen bewirkte eine stärkere IL17-Produktion bei den Kindern mit einer Erstmanifestation innerhalb der naiven, Effektor- und TEMRA-T-Zellen sowie bei den gesunden Kontrollen innerhalb der naiven T-Zellen. Auch bei den erwachsenen Diabetikern zeigte sich eine stärkere IL17-Produktion in den naiven T-Zellen bei spezifischer Stimulation.

Interessanterweise zeigte sich bei den naiven T-Lymphozyten unter *C. albicans*-Einfluss eine stärkere IL17-Produktion. Die Induktion IL17 produzierender T-Zellen durch die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen wurde u.a. auch von *Zielinski et. al.* postuliert [144]. In dieser Studie bestand der Fokus allerdings auf der IL17-Produktion durch Memory- und Effektor-T-Zellen. Die Kapazität naiver T-Zellen zur Produktion von IL17 unter Stimulation mit aCD3/aCD28 beschrieben bereits *Chen et. al.* 2007. Diese berichteten aber wie Zielinski über Memory-T-Zellen als die deutlich potenteren IL17-Produzenten [24]. Dass die spezifische Stimulation zu einer stärkeren IL17 Produktion innerhalb der naiven T-Zellen führte lässt möglicherweise den Rückschluss auf eine stärkere inflammatorische Reaktion bei vermeintlich gestörter Treg/TH17 Balance bei den Diabetikern zu.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse beim Vergleich der länger erkrankten Kinder mit den Kontrollen bei spezifischer Stimulation. Hier zeigte sich eine schwächere IL17-Produktion innerhalb der naiven, Memory- und TEMRA-T-Zellen durch die T-Zellen der Diabetiker. Weiterhin zeigte sich bei diesen bezüglich der IL17-Produktion kein Unterschied beim Vergleich der Stimuli und beim Vergleich mit den Kontrollpatienten unter unspezifischer Stimulation.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu *Honkanen et. al.*, die eine verstärkte IL17-Reaktion auf die Stimulation mit aCD3/aCD28 von Memory-T-Zellen und PBMCs sowohl bei Kindern mit einer Erstmanifestation als auch bei länger an Diabetes erkrankten Kindern konstatierten [52]. Allerdings stimulierten *Honkanen et. al* keine naiven T-Zellen, sondern Memory-T-Zellen und PBMCs, die in vivo primär für die IL17 Produktion verantwortlich sind. Weiterhin wurde eine Population untersucht, die eine mittlere Krankheitsdauer von 87 Tagen aufwies. Die in dieser Studie untersuchten Kinder mit einem länger bestehenden Diabetes waren im Mittel seit 35,4 Monaten erkrankt und standen ebenso lange unter Insulintherapie. Verschiedene Studien zeigten eine Suppression des Immunsystems durch Insulin [78, 133] und *Zhang et. al.* zeigten ein verändertes Verhalten der naiven T-Zelle durch eine Insulintherapie [141], die eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse sein kann.

Ein zu den länger an Diabetes erkrankten Kindern ähnliches Verhalten der naiven T-Zellen wäre bei den erwachsenen Diabetikern denkbar gewesen. Hier zeigte sich jedoch bei unspezifischer Stimulation eine stärkere IL17-Produktion durch Memory-T-Zellen und bei spezifischer Stimulation eine stärkere IL17-Synthese durch die Ki67 positiven T-Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

Die Ergebnisse korrelieren mit Untersuchungen von *Ferreira et. al.*, die bei erwachsenen länger an Diabetes erkrankten Probanden eine im Vergleich zu Kontrollprobanden erhöhte IL17-Produktion feststellten [35]. Für die Zellkultur wurden PBMCs verwendet, so dass sich die Population der Memory-T-Zellen nicht nur aus in vitro de novo gebildeten Memory-T-Zellen zusammensetzte wie es in dieser Studie der Fall ist. *Ferreira et. al.* zeigten die Steigerung der IL17-Synthese innerhalb der durch CD45RA-CCR6+ charakterisierten Memory-T-Zellen während in dieser Studie die Memory-T-Zellen durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD45RO und CD27 charakterisiert wurden [35]. Dennoch lassen sich die Ergebnisse einer bei erwachsenen Diabetikern gesteigerten IL17-Sekretion unter Stimulation bei ähnlichen Probandengruppen gut miteinander in Einklang bringen.

Weiterhin konnte in dieser Studie das Vorhandensein von für IL17 und IFN γ doppelt positiven T-Zellen gezeigt werden. Bei den erwachsenen Diabetikern zeigte sich unter spezifischer Stimulation im Vergleich zu den Kontrollen eine stärkere Synthese dieser IL17+IFN γ + T-Zellen innerhalb der Ki67 positiven Zellen. Bei den Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes führte die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen zu einer geringeren Bildung dieser doppelt positiven T-Zellen im Vergleich zur unspezifischen Stimulation.

Das Vorkommen von IL17/IFN γ doppelt positiven T-Zellen wurde mehrfach beschrieben und wiederholt mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [128]. Ursprünglich im Zusammenhang mit Untersuchungen zu Morbus Crohn entdeckt, konnten Studien auch bei Diabetikern diese doppelt positiven T-Zellen nachweisen [128, 93]. *Reinert-Hartwall et. al.* fanden 2015 ein stärkeres Vorkommen von IL17/IFN γ doppelt positiven T-Zellen bei Kindern mit einer Erstmanifestation im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Deutlich stärker zeigte sich dieser Effekt noch im Vergleich von Kindern mit einer fortgeschrittenen Beta-Zell-Autoimmunität. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen dem quantitativen Vorkommen von IL17+/IFN γ + T-Zellen und einem steigenden HbA1C-Wert hergestellt werden [93].

4.1.3 Gibt es Unterschiede in der Proliferationsaktivität (charakterisiert durch die Expression von Ki67) der proinflammatorischen, IL17 und IFN γ produzierenden T-Zellen in Folge der Stimulation zwischen den Patienten mit Diabetes und den Kontrollpatienten?

Die Untersuchung der Proliferationsaktivität ist ein entscheidender Faktor in der Beurteilung der T-Zell Funktion. Verschiedene Versuchsansätze zur Bestimmung der Proliferation stehen zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist die Bestimmung durch Inkubation mit CFSE wie sie in dieser Studie bei den Suppressionsversuchen angewandt wurde (siehe Kap. 2.8.4). Bei den Zellkulturexperimenten wurde die Proliferation anhand des intrazellulären Vorkommens von Ki67 durchgeführt. Ki67 ist ein strikt mit der Proliferation von Zellen assoziiertes Protein. Da es sowohl in der G1-, S-, G2- als auch M-Phase aber nicht in der G0-Phase des Zellzyklus gefunden werden kann, zeigt die Detektion eine proliferierende Zelle an [123, 108].

Die Proliferation von T-Zellen bei Diabetikern ist mehrfach erforscht. Hierbei

wurden aber in der Regel PBMC verwendet und der Fokus lag auf einer Stimulation mit den für Diabetes spezifischen Antigenen. *Mannering et. al.* führten 2004 Proliferationsversuche mit CFSE markierten T-Zellen durch. Beim Vergleich von vier Geschwistern zeigte sich eine deutlich verstärkte proliferative Antwort auf die Stimulation mit GAD65 bei dem Individuum mit einer akuten Erstmanifestation eines Diabetes. In einer weiteren Studie mit einer größeren Stichprobe konnten *Mannering et. al.* allerdings keinen Unterschied zwischen Diabetikern und gesunden Menschen feststellen [73].

In dieser Studie konnte im Rahmen des explorativen Charakters gezeigt werden, dass die naiven T-Zellen von Diabetikern und Kontrollpatienten bei unspezifischer Stimulation kein signifikant unterschiedliches Proliferationsverhalten aufwiesen. Die Vorstellung einer generellen Proliferationssteigerung bei Diabetikern als Ausdruck einer Dysbalance pro- und antiinflammatorischer T-Zellen zeigte sich hier nicht bestätigt.

Die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen führte bei den erwachsenen Diabetikern und den gesunden Kindern zu einer schwächeren Proliferationsrate. Bei den Kindern mit einem Diabetes zeigte sich kein Unterschied zwischen den Stimuli.

Eine mögliche Erklärung ist eine immunologische Überreaktion der Diabetiker im Sinne eines T-Zell-Fehlverhaltens, die aufgrund der schwächeren Immunstimulation durch den spezifischen Stimulus erkennbar wird. Dies führt dazu, dass der schwächere spezifische Stimulus bei den Kindern mit einem Diabetes eine ähnlich starke Proliferation auslösen konnte wie der unspezifische Stimulus mit aCD3/aCD28, während die gesunden Kinder schwächer auf den spezifischen Stimulus reagierten. Veränderungen des Immunsystems im Laufe der Entwicklung u.a. durch langfristige Insulintherapie [78, 133, 51] und Immunoseneszenz [89, 36, 51] führten möglicherweise wiederum dazu, dass die erwachsenen Diabetiker ebenfalls keine überschießende Reaktion auf die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen zeigten. Gegensätzlich zu dieser Überlegung zeigten die erwachsenen Diabetiker allerdings im Vergleich zu den gesunden Erwachsenen eine stärkere Entwicklung der T-Zellen mit mehr Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen und weniger naiven T-Zellen (siehe Kap. 3.1.5.4 und 4.1.1) sowie eine stärkere Produktion von IL17 und IFN γ innerhalb der Ki67+ T-Zellen unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen (siehe Kap. 3.1.5.4 und 4.1.2).

4.1.4 Zeigen sich Unterschiede in der quantitativen Verteilung von regulatorischen T-Lymphozyten (CD25+FOXP3+) nach Stimulation?

Regulatorische T-Zellen stellen eine heterogene Zellgruppe dar, deren Dysfunktion vielfach mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht wird [32, 127]. In dieser Studie entwickelten sich bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen unter proinflammatorischen Bedingungen (siehe 2.6) mehr Tregs aus den naiven T-Zellen als bei den Kontrollpatienten. Ebenfalls unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen zeigten sich innerhalb eines antiinflammatorischen Zytokinmilieus bei den erwachsenen Diabetikern mehr Tregs als bei den Kontrollen.

Ähnliche Ergebnisse konnten *Zhen et. al.* im Mausmodell im Langzeitverlauf nachweisen [142]. Hier zeigte sich eine Korrelation der erhöhten Treg-Anzahlen zu erhöhten Blutglukosespiegeln. Eine mögliche Erklärung liefern *King et. al.* mit der Feststellung, dass erhöhte Glukosespiegel u.a. eine Erhöhung der TGF β -Blutspiegel und darüber eine Steigerung der Treg-Anzahl bewirken [58]. In dieser Studie wurden allerdings humane naive T-Zellen unter in vitro Bedingungen verwendet. Weiterhin wurde TGF β und damit entsprechend *King et. al.* der Einfluss auf die Treg-Anzahl in den Versuchsgruppen in gleicher Konzentration vorgelegt, so dass Einflüsse durch Unterschiede der Glukosekonzentration oder des Stresslevels während der Inkubation ausgeschlossen werden können.

Zhen et. al. sahen eine mögliche Erklärung ihrer Ergebnisse in einer verringerten funktionalen Kapazität der Tregs, so dass eine quantitative Erhöhung der Zellzahl als Versuch zur Kompensation für eine funktionell eingeschränkte Immunsuppression verstanden werden kann [142]. Auch eine vorliegende verstärkte Inflammationsreaktion mit kompensatorisch adäquater Ausbildung des regulatorischen T-Zell-Systems ist denkbar. So zeigte sich gerade auch beim Vergleich der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten eine verstärkte inflammatorische Reaktion mit einer gesteigerten IL17- und IFN γ -Synthese (siehe Kap. 4.1.2) sowie eine geringere Anzahl naiver T-Zellen bei vermehrtem Vorkommen von Memory- und Effektor-T-Zellen (siehe Kap. 4.1.1).

Die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen führte in allen Versuchsgruppen sowohl unter proinflammatorischem als auch antiinflammatorischem Zytokinmilieu zu einer geringeren Anzahl an Tregs im Vergleich zur Stimulation mit aCD3/aCD28. Die Ausprägung der Immunantwort in Folge der Stimulation mit

dem *C. albicans*-Antigen im Vergleich zu aCD3/aCD28 wurde bereits diskutiert (siehe Kap. 4.1.1). Eine schwächere Immunreaktion in Folge der *C. albicans*-Stimulation wie sie u.a. von *Rosenzweig et. al.* beschrieben wurde korreliert gut mit den gefundenen Ergebnissen in dieser Studie [99].

Beim Vergleich der Untersuchungsgruppen unter unspezifischer Stimulation zeigte sich zwischen allen Gruppen weder in einem pro- noch in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu ein Unterschied bezüglich der Quantität an CD25+FOXP3+ Tregs. Weiterhin zeigte sich unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen kein Unterschied unter proinflammatorischen Bedingungen beim Vergleich längerfristig an Diabetes erkrankter Kinder und Erwachsener mit den Kontrollpatienten sowie unter antiinflammatorischen Bedingungen zwischen den beiden Gruppen an Diabetes erkrankter Kinder und den Kontrollpatienten.

Die quantitative Verteilung der Tregs zwischen an Diabetes erkrankten Menschen und gesunden Kontrollen wurde bereits vielfach erforscht. Die Ergebnisse dieser Studie korrelieren mit den Ergebnissen von *Lindley et. al.*, die 2005 bei erwachsenen Diabetikern keinen Unterschied in der Quantität der Tregs feststellen konnten [65]. *Brusko et. al.* veröffentlichten 2007 Ergebnisse von Untersuchungen bei an Diabetes erkrankten Kindern, die ebenfalls keinen Unterschied bezüglich des Vorkommens der Tregs zeigen konnten [17, 18].

4.1.5 Zeigen sich Unterschiede in der proliferativen Aktivität (charakterisiert durch die Expression von Ki67) der Tregs zwischen den Gruppen?

Nach Untersuchung der quantitativen Verhältnisse der regulatorischen T-Zellen wurde die Proliferationskapazität der Tregs anhand der Expression von Ki67 untersucht. In dieser Studie zeigten sich die Ergebnisse einheitlich. Sowohl in einem pro- als auch in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu zeigten sich bei unspezifischer und bei spezifischer Stimulation keine Unterschiede bezüglich der Proliferation zwischen den erkrankten und den gesunden Probanden. Bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen zeigte sich wiederum sowohl unter pro- als auch antiinflammatorischen Bedingungen eine geringere Proliferation im Vergleich zur Stimulation mit aCD3/aCD28.

Die deutlich geringere Expression von Ki67 als Proliferationsmarker bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen steht im Einklang mit den Untersuchungser-

gebnissen bezüglich der IFN γ - und IL17- Produktion sowie der Ausbildung der Tregs. Hierdurch wird die deutlich geringere Potenz des *C. albicans*-Antigen als Stimulus im Vergleich zur Stimulation mit aCD3/aCD28 erneut deutlich.

4.1.6 Gibt es Unterschiede in der Zytokinproduktion von IL10 und IL17 durch Tregs zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?

Tregs interagieren u.a. durch die Sekretion von Zytokinen mit dem immunologischen Umfeld und können so antiinflammatorisch wirken (siehe Kap. 1.2.5.3). *Asseman et al.* beschrieben bereits 1999 die essentielle Rolle von IL10 in der Inhibition von Inflammatorischen Reaktionen im Darm [9, 40]. *Voo et al.* konnten 2009 eine IL17 Produktion durch CD4+FOXP3+ Tregs zeigen. Sie konnten nachweisen, dass diese Tregs nicht im Thymus, sondern in der Peripherie generiert werden und schrieben ihnen eine mögliche zentrale Rolle in der Kontrolle von Autoimmunität und Inflammation bei [126].

In dieser Studie führte die Stimulation sowohl mit aCD3/aCD28 als auch mit dem *C. albicans*-Antigen unter proinflammatorischen Bedingungen zu keinen Unterschieden bezüglich der Zytokinproduktion zwischen den Gruppen. Die Stimulation mit *C. albicans*-Antigen führte im Vergleich zur aCD3/aCD28 Stimulation mit Ausnahme der Kinderkontrollen, bei denen sich kein signifikanter Unterschied zeigte, zu einer geringeren IL17-Synthese.

Unter antiinflammatorischen Bedingungen zeigte sich eine stärkere IL17-Produktion bei den erwachsenen Diabetikern sowohl unter Stimulation mit aCD3/aCD28 als auch mit dem *C. albicans*-Antigen. Die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen führte aber bei den erwachsenen Diabetikern im Vergleich zur aCD3/aCD28 Stimulation zu einer geringen Produktion von IL10 und IL17 und bei den Kinderkontrollen zu einer geringeren IL17-Synthese. Zwischen den Kindern mit einem Diabetes und den Kontrollen zeigte sich kein Unterschied, die Stimulation mit *C. albicans* erbrachte hier keine differenten Ergebnisse.

Die Stimulation der naiven T-Zellen in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu war gedacht um eine stärkere Ausprägung CD25+FOXP3+ Tregs zu erhalten und somit eine gezieltere Aussage über Unterschiede bezüglich der Tregs zwischen Diabetikern und gesunden Kontrollen treffen zu können. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich eine stärkere IL17-Synthese durch die Tregs der erwachsenen Diabetiker. *Voo et al.* beschrieben die Fähigkeit der Tregs zur IL17-Synthese

[126]. *Marwaha et. al.* zeigten 2010 das vermehrte Vorkommen von IL17 produzierenden CD45RA-CD25+FOXP3+ T-Zellen bei Patienten mit einer Erstmanifestation eines Diabetes im Vergleich zu gesunden Kontrollen [76]. Die Ergebnisse konnte diese Studie bei den an Diabetes erkrankten Kindern so nicht nachvollziehen. Allerdings wurde die Fähigkeit der Tregs zur IL17-Synthese hier in der Gruppe der CD25+FOXP3+ Tregs untersucht. Inwiefern differente Ergebnisse bei Untersuchung der von *Marwaha et. al.* untersuchen Gruppe der CD45RA-CD25intFOXP3low Tregs vorgelegen hätten, wurde nicht untersucht.

Die physiologische Bedeutung der IL17 produzierenden Tregs ist aktuell nicht eindeutig geklärt. TH17-Zellen spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Infektionsabwehr, werden aber auch mit Entstehung von Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht. Demgegenüber zeichnen sich die regulatorischen T-Zellen verantwortlich für die Kontrolle einer Immunreaktion (siehe Kap. 1.2.5). Eine mögliche Funktion der IL17 produzierenden Tregs kann in der Kontrolle der Immunreaktion auf der einen Seite bei gleichzeitiger Mitwirkung in der Bekämpfung von Pathogenen liegen. Derartige Mechanismen wurden auch von *Voo et. al.* und *Marwaha et. al.* in Betracht gezogen [126, 76]. Eine vergleichbare Funktion kann man in IFN γ und IL10 co-produzierenden T-Zellen finden. Dieser Effekt wurde als Feedback-Kontrolle mehrfach beschrieben [122, 126]. Gerade die mögliche Funktion als Feedback-Mechanismus macht diese chimären T-Zellen als mögliche Knotenpunkte in der Entstehung von Dysbalancen der TH17/Treg Homöostase interessant.

4.1.7 Zeigt sich für die Untergruppe der CD127 negativen Tregs (CD25+FOXP3+CD127-) ein differentes Verhalten bezüglich der quantitativen Verteilung oder der Ausprägung der IL10- und IL17-Produktion?

Die Rolle der TH17/Treg Homöostase im Rahmen der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 wurde bereits mehrfach herausgestellt. Eine mögliche Ursache wird in einer möglichen Dysfunktion der Tregs gesehen, die zu einer Dysbalance der TH17/Treg-Homöostase führen kann. Über die Untersuchungen zur quantitativen Verteilung der CD25+FOXP3+ Tregs sowie deren Proliferationsverhalten und deren Kapazitäten zur Zytokinproduktion wurde bereits berichtet (siehe Kap. 4.1.4, 4.1.5 und 4.1.6). Verschiedene Berichte rückten eine Subpopulation der Tregs

in den Fokus des Interesses. Das Oberflächenmolekül CD127 stellt den Rezeptor von IL7 dar und die nach Interaktion ablaufende Signalkaskade wird als wichtiger Faktor für das Überleben und die Proliferation von T-Zellen angesehen [25]. Während *Luczynski et. al.* über Veränderungen von CD4+CD127- T-Zellen mit geringeren prozentualen Anteilen dieser bei Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes berichteten, zeigten *Moniuszko et. al.* ein vermehrtes Vorkommen von CD4+CD25+CD127- Tregs bei Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes [68, 79].

In dieser Studie zeigten sich beim Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation und den erwachsenen Diabetikern mit den Kontrollen bei unspezifischer Stimulation in einem pro- und antiinflammatorischen Zytokinmilieu keine signifikanten Unterschiede. Die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen führte unter proinflammatorischen Konditionen bei den Erstmanifestationen und unter antiinflammatorischen Konditionen bei den erwachsenen Diabetikern zu einem höheren Anteil CD25+FOXP3+CD127- Tregs im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den Erstmanifestationen zeigte sich in einem antiinflammatorischen und bei den erwachsenen Diabetikern in einem proinflammatorischen Umfeld unter Stimulation mit *C. albicans* kein signifikanter Unterschied.

Passend zu der Studie von *Moniuszko et. al.* zeigten sich allerdings bei Betrachtung der Mediane und Mittelwerte bei unspezifischer und spezifischer Stimulation sowohl in einem pro- als auch antiinflammatorischen Umfeld bei den Kindern mit einer Erstmanifestation und den erwachsenen Diabetikern höhere Werte für die CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen, ohne dass eine statistische Signifikanz erreicht wird.

Moniuszko et. al. berichteten im Einklang u.a. mit *Sakaguchi et. al.*, dass die CD4+CD25+CD127- T-Zellen eine hohe FOXP3-Expression zeigen und stark immunsuppressive Effekte aufweisen [79, 102]. Auch diese Ergebnisse konnten in dieser Studie, allerdings ohne statistische Signifikanz, bei Betrachtung der Mediane für die Expression von CD25+FOXP3+ T-Zellen im Vergleich zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation und erwachsenen Diabetikern mit den Kontrollpatienten nachvollzogen werden. *Liu et. al.* konnten 2006 zeigen, dass die Expression von CD127 invers mit der Expression von FOXP3 korreliert [66]).

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Anzahlen an CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen können kompensatorische Mechanismen in Reaktion auf die inflammatorische Situation im T1DM sein. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung von *Moniuszko et. al.*, dass es eine starke negative Korrelation zwischen

den CD4+CD25+CD127- T-Zellen und den CD4+CD25- T-Zellen gibt, die eine wesentliche Bedeutung in der Zerstörung pankreatischer β -Zellen haben [79, 145].

Eine weitere mögliche Erklärung kann in der Tatsache zu finden sein, dass die Expression von CD127 in Folge der Aktivierung von T-Zellen herunterreguliert wird [79]. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Stimulation im Sinne einer Überreaktion oder die selektive Stimulation dieser Gruppe von T-Zellen kann im Sinne dieser Hypothese zu dem vermehrten Vorkommen CD127 negativer CD25+FOXP3+ T-Zellen führen [79]. Ein diese Hypothese stützendes Beispiel zeigt die Studie von *Yang et. al.*, die 2008 eine deutlich stärkere Sensibilität und Aktivierung bei T-Zellen von T1DM-Patienten in Folge der Stimulation mit einem Epitop von Präproinsulin zeigen konnten [135].

Die Ergebnisse beim Vergleich der Kinder mit einer Erstmanifestation und der erwachsenen Diabetiker mit den Kontrollpatienten bezüglich des Vorkommens von CD25+FOXP3+CD127- Tregs in dieser Studie ähneln zwar Ergebnissen von *Moniuszko et. al.*, allerdings wurden in der Studie von *Moniuszko et. al.* die T-Zellen von Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes untersucht. Die Untersuchung dieser Probandengruppe in unserer Studie zeigte in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu bei keinem Stimulus einen Unterschied zu den Kontrollen. In einem proinflammatorischen Umfeld zeigten sich hier bei Stimulation mit aCD3/aCD28 weniger CD25+FOXP3+CD127- Tregs bei den Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollen. Die Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen führte zu keinen signifikanten Unterschieden, der Median lag aber bei den Diabetikern unterhalb des Medians der Kontrollen.

Die quantitativen Verhältnisse der Tregs bei Patienten mit T1DM sind aktuell ungeklärt und Gegenstand vielseitiger Diskussionen. Untersuchungen von *Kukreja et. al.* stellten eine verminderte Treg-Anzahl bei Diabetikern fest, während *ElEssawy et. al.* über fehlende Unterschiede in der Frequenz der Tregs zwischen Diabetikern und gesunden Kontrollen berichteten [61, 32].

Die Feststellung einer verminderten Anzahl an Tregs bei den Kindern mit einem länger bestehendem Diabetes korreliert mit Feststellungen von *Ryba-Stanisławowska et. al.*, deren Versuchsgruppen aufgrund eines ähnlichen, wenn auch insgesamt älteren Patientenkollektivs eine gute Vergleichbarkeit zu den Versuchsgruppen unserer Studie zeigen [101]. Der Altersdurchschnitt lag bei der Studie von *Ryba-Stanisławowska et. al.* bei 16,1 Jahren und die Krankheitsdauer bei 6,43 Jahren im Vergleich zu einem Durchschnittsalter von 9,58 Jahren und einer Krankheitsdauer von 2,95 Jahren in dieser Studie. Allerdings haben *Ryba-Stanisławowska*

et. al. ihre Untersuchungen bei CD4+FOXP3+ Tregs und nicht speziell in der Untergruppe der CD127- CD25+FOXP3+ Tregs durchgeführt [101].

Ryba-Stanisławowska et. al. berichteten über verringerte Treg-Anzahlen und eine mangelnde TH17-Kontrolle. Als Erklärung führen sie eine erniedrigte FOXP3-Expression an, die wie bereits oben gezeigt, mit der quantitativen Ausprägung der stark immunsuppressiv wirkenden CD25+FOXP3+CD127- Tregs korreliert [101, 102, 66, 79]. Als Erklärung für eine geringere FOXP3-Expression führen u.a. *Long et. al.* und *Yang et. al.* eine verminderte Sensitivität für IL-2, ein für die FOXP3-Expression essentielles Zytokin, an [67, 136]. Unterschiedliche vorliegende IL2-Konzentrationen können in dieser Studie aufgrund des artifiziellen Charakters ausgeschlossen werden. Über die Sensitivität der Tregs für IL-2 kann in unserer Studie keine Aussage gemacht werden.

Beim Vergleich der Stimuli innerhalb der Gruppen zeigten sich bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen in allen Gruppen sowohl unter pro- als auch antiinflammatorischen Bedingungen weniger CD25+FOXP3+CD127- Tregs. Die schwächere Ausprägung der immunologischen Reaktion bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen im Vergleich zur Stimulation mit aCD3/aCD28 in dieser Studie wurde bereits diskutiert und zeigt sich ebenfalls in der Untersuchung der CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen.

Neben der quantitativen Verteilung der CD25+FOXP3+CD127- Tregs wurden ebenfalls deren Synthesekapazitäten für IL10 und IL17 untersucht.

Bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes zeigten sich unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen und aCD3/aCD28 sowohl unter pro- als auch antiinflammatorischen Bedingungen keine Unterschiede beim Vergleich mit den gesunden Kontrollen. Diese Ergebnisse gehen einher mit den Ergebnissen einer mRNA-Analyse von *Luczynski et. al.*, die beim Vergleich der mRNA-Level von IL10RA innerhalb einer Lymphozytenpopulation von CD25+FOXP3+CD127^{low} T-Zellen keine Unterschiede zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes und gesunden Kindern fanden [68].

Beim Vergleich der länger an Diabetes erkrankten Kinder mit den Kontrollen zeigte sich bei unspezifischer Stimulation in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu eine geringere IL17-Produktion durch die Tregs der Diabetiker. Ansonsten zeigten sich keine Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen, genauso wie beim Vergleich der erwachsenen Probanden bei Stimulation mit *C. albicans*-Antigen so-

wohl in einem pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinmilieu.

4.1.8 Gibt es Unterschiede in der Expression des Oberflächenmoleküls CD62L auf den Tregs zwischen Diabetikern und Kontrollpatienten?

Die Untersuchung des T-Zell-Verhaltens basiert auf der Untersuchung von peripheren T-Zellen. Die immunologischen Verhältnisse und Bedingungen im Zielgewebe, d.h. im Pankreas, können durch diese Studie nicht geklärt werden. Entscheidend für die immunologischen Abläufe im Pankreas ist u.a. die Migration von peripheren Immunzellen. Diese Migration findet mit Hilfe von sog. Homingrezeptoren bzw. Adhäsionsmolekülen statt. Ein auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiertes Adhäsionsmolekül ist CD62L (L-Selectin). *MacKinnon et. al.* konnten 2004 zeigen, dass CD3⁺ Lymphozyten von Diabetikern eine geringere Expression von CD62L aufwiesen als eine Vergleichsgruppe mit CD3⁺ Lymphozyten von gesunden Probanden [71]. Eine Reihe weiterer Studien, v.a. in der NOD-Maus zeigten den Einfluss von CD62L⁺ Tregs auf den Krankheitsprogress [119, 88, 100]. *Tarbell et. al.* konnten eine Normalisierung hyperglykämischer Blutzuckerwerte durch Transplantation CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ Tregs erreichen [119]. Im Menschen konnten *Ryba et. al.* zeigen, dass die Häufigkeit von CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ T-Zellen in der Peripherie bei Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes signifikant niedriger war als in einer gesunden Probandengruppe [100].

In dieser Studie zeigten sich unter pro- und antiinflammatorischen Bedingungen, sowohl bei spezifischer als auch bei unspezifischer Stimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Expression von CD62L auf allen Lymphozyten. Allerdings zeigen sich sowohl bei den erwachsenen als auch den Kindern mit einem Diabetes im Vergleich zu den gesunden Kontrollen geringere Mediane und Mittelwerte für CD25⁺FOX3⁺CD62L⁺ T-Zellen. Beim Vergleich der Stimuli zeigten sich in allen Gruppen signifikant geringere Werte für die CD62L-Expression bei Stimulation mit *C. albicans*.

Auch wenn statistisch keine signifikanten Unterschiede bewiesen werden konnten, kann bei Betrachtung der Mediane und Mittelwerte der Eindruck gewonnen werden, dass es bei den Diabetikern zu verminderten CD25⁺FOXP3⁺CD62L⁺ T-Zell-Anzahlen kommt. Dies kann im Einklang mit den Ergebnissen von *Ryba et. al.* gesehen werden [100].

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse von *Ryba et. al.* findet sich in der

Funktion des CD62L. Aufgrund seiner Funktion als Homing-Rezeptor ist er beteiligt an der Migration dieser Tregs in das Pankreasgewebe. Eine von *Ryba et. al.* beschriebene verminderte Anzahl an CD62L positiven Tregs in der Peripherie der Diabetiker im Vergleich zu gesunden Kontrollen kann darin begründet sein, dass die CD62L+ Tregs bei den Diabetikern in das Pankreasgewebe migriert sind und deshalb in der Peripherie nur eine verringerte Anzahl an CD62L+ Tregs detektiert werden kann.

In dieser Studie zeigte sich allerdings der Eindruck einer, nicht signifikanten, geringeren Anzahl von CD25+FOXP3+CD62L+ Tregs in Folge der Stimulation naiver T-Zellen. *Ryba et. al.* interpretierten ihre gefundenen Ergebnisse als Ausdruck eines möglichen Defektes in der Migrationskapazität der Tregs der Diabetiker [100]. Eine geringere Expression von CD62L, die dazu führt, dass es zu einer verminderten Migration von Tregs in das Pankreasgewebe kommt, könnte zu einer Dysbalance der pro- und antiinflammatorischen T-Zellen im Pankreas führen. Deshalb kann die T-Zell Regulation möglicherweise die proinflammatorische, autoimmune Reaktion nicht kontrollieren.

4.1.9 Zeigen sich Unterschiede in der Expression des IFN γ -Rezeptors auf der Gesamtheit der T-Zellen nach Stimulation zwischen den Gruppen?

Die Bedeutung von IFN γ in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 ist vielfach beschrieben und wurde bereits mit den Ergebnissen dieser Studie diskutiert (siehe Kap. 4.1.2). Die β -Zell destruirende Wirkung von IFN γ konnten *Herrath et. al.* 1997 zeigen [49]. Im selben Jahr berichteten *Wang et. al.* bereits über Versuche mit NOD-Mäusen, bei denen eine fehlerhafte Expression des IFN γ -Rezeptors induziert wurde. Hierbei zeigte sich, dass bei den Mäusen mit fehlerhafter Expression des IFN γ -Rezeptors die Entstehung eines Diabetes verhindert werden konnte [129].

Im Rahmen der Untersuchungen der IFN γ Produktion wurde ebenfalls die Expression des IFN γ -Rezeptors untersucht. In dieser Studie zeigte sich in der Gruppe der Kinder mit einer Erstmanifestation eine geringere Expression des IFN γ -Rezeptors bei Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen im Vergleich zur Stimulation mit aCD3/aCD28. Dies wurde im Rahmen der Potenz der verschiedenen Stimuli interpretiert. Die weiteren Untersuchungen erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen oder zwischen den Stimuli bezüglich der Ex-

pression des IFN γ -Rezeptors.

Allerdings zeigte sich bei Betrachtung von Median und Mittelwert eine nicht signifikante, stärkere Expression des IFN γ -Rezeptors bei den Kindern mit einer Erstmanifestation im Vergleich zu den Kontrollen bei unspezifischer Stimulation. Diese stärkere Expression des IFN γ -Rezeptors kann sowohl Ausdruck eines stärker ausgeprägten proinflammatorischen T-Zell Systems sein, als auch im Rahmen der Hochregulation des proinflammatorischen Systems aufgrund der akuten Inflammationslage bei den Kindern mit einer Erstmanifestation interpretiert werden. Dies passt zu den Ergebnissen einer stärkeren IFN γ -Sekretion durch die proliferierenden Lymphozyten der Kinder mit einer Erstmanifestation (siehe Kap. 4.1.2).

4.2 Suppressionsversuche

Nachdem in den Zellkulturexperimenten eine phänotypische Charakterisierung und Bestimmung des Zytokinprofils nach Polarisierung naiver T-Lymphozyten vorgenommen war, wurden Suppressionsversuche durchgeführt. Die Versuchsdurchführung wurde in Kapitel 2.7 beschrieben und die Ergebnisse sind in Kapitel 3.2.3 dargestellt.

Bei sehr kleinen Fallzahlen ($n=2$) innerhalb der bei den Suppressionsversuchen verglichenen Gruppen aufgrund des explorativen Charakters der Studie wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

Es zeigte sich, dass bei den Gruppen der Diabetiker die Indexwerte für die Steigerung der Proliferation oberhalb der Indexwerte der Kontrollgruppen liegen. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die Zugabe der regulatorischen T-Lymphozyten bei den Proben der Diabetiker in unserem Versuch scheinbar zu einer geringeren Hemmung der Proliferation bzw. zu einer geringeren Regulation als bei den gesunden Kontrollpatienten führte.

Diese Ergebnisse legen eine generell qualitativ eingeschränkte T-Zell-Regulation durch die induzierten regulatorischen T-Lymphozyten nahe, passend zu Feststellungen von *Lindley et. al.* oder *Brusko et. al.* [65, 17].

Allerdings ist eine Unterscheidung zwischen der vermuteten eingeschränkten suppressiven Funktion der Tregs und einer ebenso möglichen, erhöhten Resistenz der Effektor-Zellen gegen die regulative Funktion der Tregs nicht möglich. Um hier eine Unterscheidung durchführen zu können wären weitere Co-Kulturen von Tregs mit Effektor-Zellen von allogenen, gesunden Probanden notwendig. Studien bei anderen autoimmun vermittelten Erkrankungen wie bspw. der Multiplen Sklerose konnten in derartigen Versuchen intrinsische Defekte der Tregs nachweisen [124,

40].

In dieser Arbeit wurde die Suppressionsfähigkeit anhand der Inhibition der Proliferation der Effektor-Zellen bestimmt. Eine weitere Abklärung inwiefern es bei den Tregs der Diabetiker zu einer ebenso verringerten Inhibition der Sekretion von $\text{IFN}\gamma$ oder IL17 kommt oder gegenläufig zu einer verstärkten Sekretion, erscheint sinnvoll.

4.3 Beeinflussung des Verhaltens naiver T-Zellen durch Blockade von $\text{IFN}\gamma$ oder Zugabe von $\text{TGF}\beta$

Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente und der Suppressionsversuche bestärkten die Vermutung einer gestörten Homöostase der pro- und antiinflammatorischen T-Zell-Systeme. In Einklang mit der aktuellen Studienlage ist die spezifische Immuntherapie ein wichtiger Ansatz zur Therapie eines Diabetes mellitus Typ 1 [75]. In Anbetracht der Erkrankungshäufigkeit sowie der Krankheitsfolgen, wie z.B. die chronische Niereninsuffizienz, für die individuelle Person aber auch das Gesundheitssystem insgesamt, entwickelt sich die Suche nach einer adäquaten kausalen Therapie der Insulitis zu einer imminent wichtigen Aufgabe.

Auf der Suche nach möglichen Therapieansätzen ist die Beeinflussung der offensichtlich gestörten T-Zell-Homöostase ein primäres Ziel. *Marwaha et. al.* beschrieben 2014 in einem ausführlichen Artikel die Auswahl der $\text{IFN}\gamma/\text{IL17}$ -Achse als vielversprechendes Therapieziel [75].

Auch ohne Kenntnis der genauen zu Grunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen zeigte sich der experimentelle Eingriff in die proinflammatorische Reaktion durch Blockade von $\text{IFN}\gamma$ und in die antiinflammatorische Reaktion durch Zugabe von $\text{TGF}\beta$ als sinnvoller Ansatzpunkt zur Beeinflussung der Polarisierung naiver T-Lymphozyten in antiinflammatorischer Richtung, um so durch eine Beeinflussung der Immunreaktion die Insulitis aufzuhalten und eine vollständige Zerstörung von β -Zellen zu verhindern.

4.3.1 Beeinflussung des Verhaltens naiver T-Zellen durch Blockade von $\text{IFN}\gamma$

Die $\text{IFN}\gamma$ -Blockade wurde aufgrund der vielfach in der Literatur beschrieben und in dieser Arbeit u.a. bei den Kindern mit einer Erstmanifestation festgestellten

verstärkten Produktion von $\text{IFN}\gamma$ gewählt [129, 49, 128].

Die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ führte bei den erwachsenen Diabetikern und den Kindern mit einer Erstmanifestation zu einer verminderten T-Zell Differenzierung. Bei den Kindern mit einer Erstmanifestation zeigte sich die Proliferation ebenfalls geringer. Diese Unterschiede zeigten sich bei den Erwachsenen und den Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes nicht.

Die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion zeigte sich bei den Erwachsenen und den Erstmanifestationen verringert, demgegenüber war die Expression des $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptors bei den Erwachsenen und den Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes gesteigert. Bei den Erstmanifestationen zeigte sich zusätzlich die IL17-Produktion innerhalb der naiven und der Effektor-T-Lymphozyten reduziert.

Die Untersuchung des regulatorischen Systems bei den erwachsenen Diabetikern zeigte insgesamt eine verringerte Quantität der regulatorischen T-Lymphozyten, aber eine stärkere Proliferation der Tregs. Bei den Kindern mit einem längere Zeit bestehendem Diabetes zeigten sich gegenteilig mehr regulatorische T-Lymphozyten, die Kinder mit einer Erstmanifestation zeigten keinen quantitativen Unterschied.

Campbell et. al. und *Debray-Sachs et. al.* konnten nachweisen, dass die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ im Diabetes-Mausmodell zu einer Reduktion der Insulitis führte bzw. den Ausbruch eines Diabetes verhindern konnte [19, 30]. In der aktuellen Therapie anderer Autoimmunerkrankungen befindet sich $\text{IFN}\gamma$ ebenfalls im Fokus. Zur Therapie der Psoriasis wird Ustekinumab, ein Antikörper gegen die p40 Untereinheit, die sowohl in IL12 als auch in IL23 gefunden wird, eingesetzt. Dieser Antikörper vermag sowohl in den $\text{IFN}\gamma$ -Stoffwechsel über Blockade von IL12 als auch in den IL17-Stoffwechsel über Blockade von IL23 einzugreifen [75].

In dieser Studie führte die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ dazu, dass die naiven T-Zellen der Diabetiker eine geringer ausgeprägte proinflammatorische Reaktion auf die Stimulation zeigten. Der Umstand, dass ebenfalls die IL17-Produktion bei den Kindern mit einer Erstmanifestation beeinflusst wurde, zeigt zum Einen das immunsupprimierende Potential in Bezug auf die für den Typ 1 Diabetes relevanten proinflammatorischen Systeme und zum Anderen die Plastizität der $\text{IFN}\gamma$ - und IL17 produzierenden T-Zellen. Ebenfalls konnte durch Analyse der Proliferation gezeigt werden, dass die inhibierende Wirkung von $\text{IFN}\gamma$ auf die regulatorischen T-Lymphozyten durch die $\text{IFN}\gamma$ -Blockade reduziert werden konnte. Die quantitativ geringere Ausprägung der Tregs wurde als Feedback-Reaktion aufgrund einer

durch die IFN γ -Blockade bewirkten geringeren Inflammation gewertet. Die erhöhten Werte für den IFN γ -Rezeptor können mit der Messmethode begründet werden. Bei der Bindung von IFN γ an seinen Rezeptor kommt es zu einer Dimerisierung und Konformitätsänderung des Rezeptors. Der Antikörper gegen den IFN γ -Rezeptor bindet an die β -Kette, eine Bindung des Antikörpers kann nach Konformitätsänderung des Rezeptors bei IFN γ -Bindung nicht mehr stattfinden, so dass nur unbesetzte IFN γ -Rezeptoren detektiert werden können [13]. Auch eine Hochregulation der Expression des IFN γ -Rezeptors zur Erhöhung der Bindungsdichte ist denkbar.

4.3.2 Einfluss von TGF β

Die Zugabe von TGF β sollte das regulatorische T-Zell-System beeinflussen. Ziel war es eine TGF β abhängige Stimulation der Tregs, in einem ansonsten proinflammatorischen Zytokinmilieu, zu untersuchen. Die Stimulation des regulatorischen T-Zell-Systems wurde aufgrund einer möglichen Dysfunktion der Tregs, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, durchgeführt.

Der Einfluss von TGF β führte zu einer Verschiebung der T-Zell-Differenzierung mit erhöhten Zahlen an naiven T-Lymphozyten, sowie weniger Memory-T-Lymphozyten bei den erwachsenen Diabetikern und den Kindern mit einer Erstmanifestation. Bei den Erwachsenen zeigte sich ebenfalls die Proliferation verringert, dieser Einfluss zeigte sich bei den Kindern nicht.

Weiterhin führte der Einfluss von TGF β zu einer Beeinflussung der Zytokinausschüttung mit u.a. einer geringeren Bildung von IFN γ bei den Erwachsenen und den Kindern mit einer Erstmanifestation.

Die Betrachtung der T-Zell-Regulation unter Zugabe von TGF β zeigte, dass bei den erwachsenen Diabetikern die regulatorischen T-Lymphozyten quantitativ vermindert waren, ebenso wie die IL17-Produktion durch Tregs und die Expression von CD62L vermindert waren. Bei den Kindern hingegen zeigte sich eher eine Steigerung der Zytokinproduktion, zumindest in der Untergruppe der CD127 negativen regulatorischen T-Lymphozyten.

TGF β ist ein potentes immunregulierendes Zytokin. In dieser Studie zeigte sich die Hemmung der T-Zell-Differenzierung und die modulierenden Einflüsse auf das regulatorische T-Zell-System. Durch die TGF β -Zugabe konnte eine Reduktion der IFN γ -Ausschüttung bewirkt werden. Die zentrale Rolle von IFN γ in der Patho-

genese des Diabetes wurde bereits ausführlich diskutiert. Die proregulatorischen Funktionen von $TGF\beta$ wurden ebenfalls von *Li et. al.* 2006 beschrieben und sind ein zentraler Aspekt der Immunregulation [63]. Weiter beschrieben *Du et. al.* den Einfluss von $TGF\beta$ im Diabetes-Mausmodell [31]. Hier zeigte sich $TGF\beta$ als Schlüsselzytokin in der Protektion und Prävention einer Manifestation eines Diabetes durch eine endokrine Wirkung auf regulatorische T-Zellen.

Sowohl die Blockade von $IFN\gamma$ als auch die Zugabe von $TGF\beta$ zeigten inflammationshemmende Wirkung bei den Lymphozyten von an Diabetes erkrankten Probanden. Bei einem therapeutischen Einsatz *in vivo* können diese Eigenschaften möglicherweise die β -Zell-Zerstörung aufhalten und so die endgültige Manifestation eines Diabetes verhindern. Generell muss der Einsatz immunmodulatorischer Zytokine kritisch hinterfragt werden. Jede immunsuppressive Therapie birgt das Risiko nicht kontrollierbarer Infektionen, obwohl eigentlich nur die überschießende Immunreaktion reguliert werden soll. Es bleibt die Feststellung einer möglichen Eingrenzung der inflammatorischen Reaktion durch die Blockade von $IFN\gamma$ und durch die Zugabe von $TGF\beta$.

4.4 Limitierende Einflussfaktoren

Die in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnisse unterliegen verschiedenen Limitationen aufgrund des experimentellen Charakters der Studie.

4.4.1 *In vitro* Verhältnisse

Eine wesentliche Limitation stellt der artifizielle Charakter der Untersuchung dar. Zunächst einmal spiegelt die gezielte Untersuchung der naiven T-Lymphozyten nicht die Verhältnisse eines multizellulären Milieus wieder wie es *in vivo de facto* vorherrscht. Die Aktivierung der T-Lymphozyten mit unspezifischen und stark potenten Antigenen wie aCD3 und aCD28 wird eine deutlich stärkere und mit unterschiedliche Immunreaktion auslösen als dies *in vivo* vorkommende Antigene können, die nur von bestimmten T-Lymphozyten erkannt werden. Diese Feststellung konnte innerhalb dieser Arbeit beim Vergleich der Stimulation mit aCD3/aCD28 und dem *C. albicans*-Antigen gezeigt werden.

Ein weiterer Faktor ist die Zugabe der Antigenpräsentierenden Zellen. Diese Zugabe soll die *in vivo* vorherrschenden Zell-Zell-Kontakte imitieren und somit

die Immunreaktion befördern. In vivo vorkommende antigenpräsentierende Zellen wie beispielsweise Dendritische Zellen tragen zur Immunreaktion aber nicht nur durch die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten bei, sondern sezernieren aktiv pro- und antiinflammatorische Zytokine, die die Immunreaktion beeinflussen. Eine Vergleichbarkeit ergibt sich dadurch, dass in allen Versuchsansätzen gleichartige Antigenpräsentierende Zellen zugesetzt wurden.

Eine Vielzahl verschiedener zellulärer und humoraler Bestandteile tragen zu den immunologischen Reaktionen in vivo bei. Die Zusammensetzung des biologischen Milieus unterliegt fortwährender Veränderungen. Durch diverse zellbiologische Prozesse kommt es zu einem ständigen Zu- und Abfluss von Bestandteilen, die zur Immunreaktion beitragen. Dieses fließende System kann in vitro mit einer einzeitigen Stimulation und einem fixen Messzeitpunkt nicht nachgeahmt werden und die Prozesse exakt abbilden.

Den beschriebenen Nachteilen der in vitro Versuchsanordnung steht der Vorteil eines reproduzierbaren Systems gegenüber. Durch eine Standardisierung der Versuchsabläufe ist es möglich beobachtete Veränderungen bestimmten Mechanismen oder Bestandteilen zuzuordnen. Auch in diesem in vitro System zeigen sich multiple Einflüsse, deren Zusammenspiel nicht immer eindeutige Aussagen zu lassen. Allerdings zeigt sich durch die Minimierung der Anzahl an Einflüssen häufig eine eindeutigere Struktur der zu den Beobachtungen führenden Mechanismen.

4.4.2 Periphere T-Lymphozyten zur Erforschung einer Erkrankung im Pankreas

Die Untersuchung peripherer T-Lymphozyten zeigte sich als praktikable Möglichkeit der Untersuchung von T-Lymphozyten bei menschlichen Patienten. Die Gewinnung dieser T-Lymphozyten konnte im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Blutentnahme ohne zusätzlichen Aufwand während des klinischen Aufenthaltes stattfinden.

Ausgehend von einer generellen Störung des T-Zell-Systems sollten die peripher vorliegenden T-Lymphozyten gleichartigen Veränderungen und Reaktionen unterliegen wie die, die im Pankreas an der akuten Insulitis beteiligt sind. Dennoch zeigt sich unklar, ob die peripher vorhandenen T-Lymphozyten wirklich das Reaktionsverhalten der die Inflammation auslösenden Zellen widerspiegeln. Es ist durchaus denkbar, dass die aberranten autoreaktiven Zellen nach Einwanderung in

das Pankreas für eine Immunreaktion sorgen, die aufgrund ihrer geringen Anzahl in der Peripherie bei den *in vitro* Versuchen mit den peripheren T-Lymphozyten unauffällig bleibt.

4.4.3 MACS-Separation

Die Grundlage der gezielten Untersuchung der T-Lymphozyten bildete die magnetische Separation bestimmter T-Lymphozyten aus der Gesamtheit der peripheren mononukleären Zellen. Das MACS-Verfahren stellte hierbei eine gut durchzuführende Methode dar. Insgesamt zeigte sich nach Isolierung eine gute Reinheit der Zelllinien, sowohl für die Gruppe der naiven T-Lymphozyten als auch die Gruppe der induzierten CD25 positiven T-Lymphozyten. Es wird davon ausgegangen, dass die minimal verbliebenen, nicht zur definierten Gruppe gehörenden Zellen aufgrund ihrer geringen Anzahl keinen richtungsweisenden Einfluss auf die Ergebnisse zum Messzeitpunkt nehmen konnten. Dennoch muss die Tatsache, dass die untersuchten Gruppen keine absolute Reinheit aufwiesen mit bedacht werden.

Ein weiterer methodenbedingter Einflussfaktor kann die Verwendung der MACS-Beads bei der Isolierung der CD25 positiven Zellen darstellen. Die verbleibenden Beads sollen bis sie sich wieder ablösen keine relevanten Interaktionen auslösen können oder mit der Zellfärbung nach mehreren Tagen interagieren [77]. Dennoch handelt es sich hierbei um eine positive Selektion und die an die CD25 positiven Zellen gebundenen Beads können theoretisch eine vorzeitige Zellaktivierung auslösen, da sie zunächst an den Zellmolekülen verbleiben [134]. Inwieweit diese Interaktionen möglich sind ist nicht vollständig geklärt.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie liefern mehrere Ansätze für eine Vertiefung und Fokussierung der Erforschung der Polarisierbarkeit naiver T-Lymphozyten. Besonders die Heterogenität der Ergebnisse in den unterschiedlichen Gruppen macht eine weitergehende Forschung notwendig und zeigt wie komplex die pathologischen Zusammenhänge des Immunsystems besonders in Bezug auf Autoimmunerkrankungen sind.

Zunächst einmal wäre eine Bestätigung der Ergebnisse in einem größeren Patientenkollektiv wünschenswert. Weiterhin macht eine Überprüfung der Ergebnisse anhand weiterer Untersuchungsmethoden zur Bestätigung der durchflusszytometrischen Befunde Sinn. Eine Testung der Zytokinproduktion im Überstand mittels

ELISA (Enzym linked immunosorbend assay) und die Untersuchung bestimmter genetischer Expressionsmuster (bspw. Transkriptionsfaktoren wie $\text{ror}\gamma$ oder FOXP3) mittels RNA-Quantifizierung, bspw. durch eine Real-Time PCR, stellen gut durchführbare ergänzende Untersuchungen dar.

Eine wichtige weiterführende Untersuchung ist die Bestimmung epigenetischer Regulationsmuster. Der Methylierungsgrad bspw. von Transkriptionsfaktoren wie FOXP3 kann erhebliche Rückschlüsse auf die Entstehung des Diabetes zu lassen und wie bereits diskutiert die Heterogenität der Patientengruppen erklären. Besonders aufgrund der Ergebnisse, die nicht nur eine IL17-Produktion durch regulatorische T-Lymphozyten gezeigt haben, sondern auch Differenzen zwischen den erwachsenen Diabetikern und den Kontrollprobanden aufzeigen konnten, spielt die epigenetische Regulation dieser T-Zell-Plastizität möglicherweise eine entscheidende Rolle.

Ein weiterer Punkt ist der Stimulus. In dieser Studie wurden die T-Lymphozyten mit einer unspezifischen Stimulation und einem allgemein pathogenen Antigen stimuliert. Die Zerstörung der pankreatischen β -Zellen beruht aber auf der Bildung autoreaktiver T-Lymphozyten gegen körpereigene Strukturen. Die Untersuchung des T-Zell-Verhaltens bei Stimulation mit diesen spezifischen Antigenen gegen GAD65, Insulin oder IA-2 zeigt möglicherweise ein sehr ähnliches Reaktionsmuster. An dieser Stelle sind sicherlich zunächst Versuche mit PBMCs sinnvoller als die alleinige Stimulation der naiven T-Lymphozyten.

Die Fortführung der humanen T-Zell-Forschung bei an Diabetes erkrankten Probanden ist nicht nur aufgrund der massiven sozialmedizinischen Relevanz imminently wichtig. Durch weitere Untersuchungen des Verhaltens von menschlichen T-Lymphozyten ist eine genauere Identifizierung veränderter und die Pathogenese bestimmender Moleküle möglich. Aus einem besseren Verständnis der Pathogenese leitet sich eine zielgerichtete Therapie der Insulitis ab, mit der eine vollständige Zerstörung pankreatischer β -Zellen verhindert werden kann. Die Ansätze des gezielten immunotherapeutischen Eingriffes in Regulationsvorgänge des Immunsystems bedarf weiterer Forschung. Neben den Auswirkungen der $\text{IFN}\gamma$ -Blockade und der $\text{TGF}\beta$ -Zugabe auf die Gesamtheit des Immunsystems muss auch eine mögliche Umsetzung der in vitro Versuche in vivo untersucht werden. Ziel muss die Reduktion der β -Zell-Zerstörung ohne eine unverhältnismäßige Steigerung des Infektionsrisikos sein.

5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die über eine Zerstörung pankreatischer Beta-Zellen der Langerhans-Inseln zu einem absoluten Insulinmangel führt. Ursächlich für die Zerstörung des Pankreasgewebes sind autoreaktive T-Zellen, die eine Entzündungsreaktion (Insulitis) im Pankreas bewirken.

Zentrales Thema der Promotionsarbeit ist die Erforschung grundlegender quantitativer und qualitativer Eigenschaften von T-Zellen von Diabetikern im Vergleich zu gesunden, alters-gleichen Kontrollpersonen. Der Fokus der Arbeit liegt dabei auf der Analyse von naiven T-Zellen und ihrer Polarisierbarkeit in proinflammatorische Th17 (Interleukin-17-produzierende) Zellen und regulatorische T-Zellen (Tregs), die die Inflammation unterdrücken können. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten tendenziell eine proportionale Vermehrung von proinflammatorischen T-Zellen (Th17 Zellen) im peripheren Blut von Typ1 Diabetikern.

Aus dem Vollblut wurden mittels Ficoll-Dichte-zentrifugation periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) gewonnen. Über magnetisch aktivierte Zell-Separation (MACS) wurden naive T-Zellen (CD4+CD45RA+CD27+) aus den PBMCs isoliert. Diese naiven Zellen wurden angeregt sich zu adulten, immun-kompetenten Zellen zu differenzieren. Die Antigenstimulation der T-Zellen wurde imitiert durch Aktivierung mit Antikörpern gegen die Moleküle CD3 und CD28 oder einem *C. albicans*-Antigen. Die Stimulation wurde unter Co-Kultivierung mit autologen antigenpräsentierenden Zellen durchgeführt. Die Richtung der Differenzierung wurde durch Zugabe verschiedener Zytokin-Cocktails beeinflusst.

Nach Abschluss der Kultivierung wurde sowohl der Phänotyp der Zellen als auch deren Fähigkeit bestimmte Zytokine zu produzieren mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Weiterhin wurden Suppressionsassays durchgeführt, bei denen die Suppressionsfähigkeit von aus naiven T-Zellen induzierten Tregs auf autologe PBMCs von Typ 1 Diabetes Patienten überprüft wurde.

In dem zunächst durchgeführten Vergleich von Kindern mit einer Erstmanifestation mit gesunden Kontrollen konnte eine stärkere IFN γ -Produktion gezeigt werden mit signifikanten Unterschieden innerhalb der Ki67+ Zellen. Interessan-

terweise zeigte sich diese stärkere $\text{IFN}\gamma$ Sekretion der T-Zellen der Diabetiker unter Bedingungen, die die Expression von TH17-Zellen fördern sollten. Zusätzlich konnten T-Zellen nachgewiesen werden, die für $\text{IFN}\gamma$ und IL17 doppelt positiv waren.

In weiteren Versuchen wurden auch Vergleiche zwischen längere Zeit an Diabetes erkrankten Kindern und erwachsenen Diabetikern mit gesunden Kontrollen durchgeführt. Bei den erwachsenen Diabetikern konnten dabei mehr $\text{IFN}\gamma^+/\text{IL17}^+$ T-Zellen innerhalb der Ki67^+ T-Zellen nachgewiesen werden als bei den Kontrollen.

Die Zellkulturexperimente wurden im Weiteren mit *C. albicans*-Antigen als einem spezifischen Stimulus des Immunsystems durchgeführt. Die Untersuchung zeigte zunächst einmal, dass das *C. albicans*-Antigen bezüglich Proliferation und T-Zell-Differenzierung ein deutlich schwächerer Stimulus im Vergleich zur Stimulation mit $\text{aCD3}/\text{aCD28}$ war. Beobachtet werden konnte allerdings, dass es durch Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen insgesamt zu einer stärkeren Aktivierung des TH17-Zell-Systems kam mit Ausnahme der längere Zeit an einem Diabetes erkrankten Kinder, die eine geringere IL17-Produktion im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen.

Insgesamt zeigten sich teils deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen der Diabetiker, so dass von einer Beeinflussung der Ergebnisse durch Krankheitsdauer, Krankheitsaktivität, Alter der Probanden und Therapiedauer ausgegangen werden muss.

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens ergab sowohl bei den proinflammatorischen T-Zellen als auch bei den Tregs keine Unterschiede zwischen den Diabetikern und den Kontrollpatienten, ebenso wie die quantitative Untersuchung der Ausbildung von $\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ Tregs aus den naiven T-Zellen unter unspezifischer Stimulation. Unter spezifischer Stimulation hingegen zeigten sich mehr Tregs bei den Kindern mit einer Erstmanifestation und den erwachsenen Diabetikern.

Ebenfalls unter Stimulation mit dem *C. albicans*-Antigen zeigten sich unter proinflammatorischen Bedingungen bei den Kindern mit einer Erstmanifestation und unter antiinflammatorischen Bedingungen bei den erwachsenen Diabetikern ein signifikant höherer Anteil CD127^- Tregs ($\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$) im Vergleich zu den Kontrollprobanden.

Interessanterweise zeigte sich bei den erwachsenen Diabetikern sowohl bei spezifischer als auch bei unspezifischer Stimulation eine stärkere Produktion von IL17 durch die Tregs.

Die Untersuchung der Expression des Homing-Rezeptors CD62L auf den Tregs ergab keine signifikanten Unterschiede, aber eine höhere Expression bei allen Dia-

betikern im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen und die Untersuchung des $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptors erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings zeigten sich die Mediane und Mittelwerte bei den Kindern mit einer Erstmanifestation im Vergleich zu den Kontrollen bei unspezifischer Stimulation erhöht.

Zur Ergänzung der Zellkulturexperimente wurden im Weiteren Suppressionsversuche mit aus naiven T-Zellen induzierten Tregs durchgeführt. Die Suppressionsversuche konnten eine geringere Hemmung der Proliferation durch die induzierten Tregs der Diabetiker zeigen und damit auf eine mögliche Dysfunktion der Tregs deuten.

Um Möglichkeiten der Beeinflussung des Immunsystems zu untersuchen wurden die Zellkulturen erneut unter Blockade von $\text{IFN}\gamma$ und Zugabe von $\text{TGF}\beta$ durchgeführt. Die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ führte zu einer geringer ausgeprägten Differenzierung und Proliferation der T-Zellen. Weiterhin konnten in der intrazellulären Färbung weniger $\text{IFN}\gamma$ positive T-Zellen gefunden werden und es zeigte sich eine stärkere Expression des $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptors. Bei den Kindern mit einer Erstmanifestation zeigte sich zusätzlich auch eine geringere Ausprägung der IL17^+ T-Zellen. Hier ergaben sich keine Unterschiede in der Quantität der Tregs. Die erwachsenen Diabetiker zeigten hier weniger Tregs, dafür aber eine stärkere Proliferation innerhalb der Tregs. Bei den Kindern mit einem längere Zeit bestehenden Diabetes hingegen zeigten sich keine quantitativen Unterschiede.

Die Beeinflussung durch Zugabe von $\text{TGF}\beta$ bei den erwachsenen Diabetikern und den Kindern mit einer Erstmanifestation führte zu einer geringeren T-Zell Differenzierung mit mehr naiven T-Zellen und weniger Memory-T-Zellen sowie zu einer geringeren $\text{IFN}\gamma$ -Expression. Bei den Erwachsenen zeigte sich ebenso eine geringere Proliferation, geringe Anzahlen für Tregs sowie eine geringe Ausprägung der Expression von CD62L und der Produktion von IL17 durch Tregs.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede zwischen den proinflammatorischen T-Zellen sowie den induzierten Tregs der Diabetiker im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gibt. Insbesondere die Bedeutung von $\text{IFN}\gamma$ bei den Erstmanifestation konnte gezeigt werden. Aber auch die Sekretion von IL17 oder die Expression von CD62L auf den Tregs stellen interessante Ansatzpunkte zur weiteren Erforschung des Diabetes dar. Weiterhin zeigten die Suppressionsversuche eine gestörte Regulation durch die induzierten Tregs bei den Diabetikern. Sowohl die Blockade von $\text{IFN}\gamma$ als auch die Zugabe von $\text{TGF}\beta$ zeigten inflammationshemmende Wirkung bei den Lymphozyten der Diabetiker *in vitro* und stellen

interessante Ansatzpunkt für eine mögliche Therapie dar.

6 Abstract

Type 1 diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease which causes a destruction of pancreatic beta cells and results in an absolute lack of insulin. Autoreactive T-cells cause an inflammation in the pancreas (insulinitis) and are responsible for the destruction of the beta cells.

Main topic of this thesis is the investigation of fundamental quantitatively and qualitatively features of T-cells in humans with type 1 diabetes mellitus in comparison to healthy, age-matched controls. The main point of view is directed on the analysis of naive T-cells and their ability to polarize in proinflammatory TH17-cells (Interleukin 17 producing T-cells) and regulatory T-cells (Tregs) which are able to suppress an inflammatory reaction. Earlier studies in our work group suggested a proportional increase of proinflammatory T-cells in the peripheral blood of patients with type 1 diabetes mellitus.

A density centrifugation with Ficoll was performed to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Magnetic activated cell sorting (MACS) was used to extract naive T-cells (CD4+CD45RA+CD27+) out of the PBMC-group. These isolated naive T-cells were stimulated to differentiate into mature, immunocompetent T-cells. The stimulation was imitated by T-cell activation with antibodies against CD3 and CD28 or with a *C. albicans*-antigen. The activated T-cells were co-cultured with autologous, antigen presenting cells (APC). The direction of differentiation was influenced by supplementation of various cytokine-cocktails.

After finishing the cultivation, the phenotype of the T-cells as well as their ability to produce distinct cytokines was determined by fluorescent activated cell sorting (FACS). Furthermore, suppression assays were performed in which the ability of (out of naive T-cells induced) Tregs to suppress autologous PBMC of humans with type 1 diabetes mellitus was investigated.

First there was a comparison between children with a new-onset of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and healthy controls. This investigation showed a stronger production of interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) with significant differences in the Ki67 positive subgroup in T1DM children. Interestingly this was found under culture conditions which should promote the expression of an TH17-phenotype. Additio-

nally, T-cells were discovered which were double positive for IFN γ and IL17.

In further experiments the T-cells of children and adults with a long-standing diabetes mellitus were compared to healthy donors. In the adult group it was possible to show more IFN γ /IL17 positive T-cells in the Ki67 positive subgroup in comparison to the controls.

For further experiments an *C. albicans*-antigen was used as a T-cell activator. Primarily it was obvious that the *C. albicans*-antigen was a much weaker stimulus concerning proliferation and T-cell differentiation. But overall there was a stronger activation of the TH17-cell system except for the children with long-standing diabetes mellitus who had a lower amount of IL17 in comparison to the healthy controls.

All together there were clear differences between the different groups of humans with type 1 diabetes mellitus so that the results are probably influenced by activity und duration of disease as well as patients age and duration of therapy.

The research concerning the proliferation as well as the quantity of CD25+FOXP3+ Tregs showed neither differences for the proinflammatory T-cells nor the Tregs under unspecific stimulation. When specific stimulation was performed, the children with a new-onset of diabetes mellitus and the adults with diabetes mellitus showed an increased number of Tregs.

Additionally, under stimulation with *C. albicans* under proinflammatory culture conditions there was a higher proportion of CD127 negative Tregs (CD25+FOXP3+CD127-) in the children with a new-onset diabetes and the adult diabetics in comparison to the healthy controls.

Surprisingly there was a stronger IL17-production among the Tregs in the adult diabetics under specific as well as under unspecific stimulation.

Although investigations on expression of the homing receptor CD62L on the surface of Tregs yield no significant differences, there was a non significant higher expression in every diabetic group in comparison to the controls. Similar the expression of the IFN γ -receptor shows no significant differences but the consideration of the values for median and average showed higher values in the children with newly onset diabetes than in the healthy controls under unspecific stimulation.

Furthermore, suppression assays were performed with induced Tregs which were induced out of naive T-cells. In this investigation a weaker ability to inhibit the proliferation of T-cells by the induced Tregs of the diabetics were found. This is a possible hint for a dysfunction of Tregs in humans with type 1 diabetes mellitus.

To investigate possibilities for influencing the immune system the earlier performed cell cultures were repeated now with blocking IFN γ or supplement TGF β .

The blocking of IFN γ leads to a weaker differentiation and proliferation of T-cells. Furthermore, the intracellular staining showed decreased numbers of IFN γ positive T-cells but a higher expression rate of the IFN γ -receptor. The children with a new-onset of diabetes mellitus showed additionally lower values for IL17 positive T-cells but therefore a greater proliferation rate among the Tregs. On the other hand there were no quantitative differences noted in the children with long-standing diabetes.

Supplementation of TGF β leads to a weaker T-cell differentiation with greater numbers of naive T-cells and lower numbers of memory T-cells as well as a lower IFN γ -expression rate in the T-cells of the children with a new-onset diabetes and the adult diabetics. The adult diabetics showed furthermore a weaker T-cell proliferation, decreased Treg numbers and a lower expression of CD62L as well as a lower production of IL17 by Tregs.

All together it was possible to show differences between the proinflammatory T-cells and the induced Tregs of humans with diabetes mellitus in comparison to healthy controls. Especially the meaning of IFN γ for the disease in children with new-onset diabetes mellitus was shown. Furthermore, the secretion of IL17 or the expression of CD62L on Tregs are interesting starting points for further investigations. Additionally, it was possible to show that the ability to inhibit the proliferation of inflammatory T-cells by the induced Tregs of the diabetics is disturbed. The blocking of IFN γ as well as the supplementation of TGF β showed inflammation inhibiting effects in the T-cells of the diabetics in vitro and is an interesting starting point as a potential future therapy.

Literatur

- [1] Abbas, Abul K., Murphy, Kenneth M. und Sher, Alan. „Functional diversity of helper T lymphocytes“. In: *Nature* 383.6603 (1996), S. 787–793.
- [2] Acosta-Rodriguez, E. V. et al. „Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells“. In: *Nat. Immunol.* 8.9 (2007), S. 942–949.
- [3] Acosta-Rodriguez, E. V. et al. „Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells“. In: *Nat. Immunol.* 8.6 (2007), S. 639–646.
- [4] Aggarwal, S. et al. „Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17“. In: *J. Biol. Chem.* 278.3 (2003), S. 1910–1914.
- [5] Annunziato, F. et al. „Defining the human T helper 17 cell phenotype“. In: *Trends Immunol.* 33.10 (2012), S. 505–512.
- [6] Annunziato, F. et al. „Phenotypic and functional features of human Th17 cells“. In: *J. Exp. Med.* 204.8 (2007), S. 1849–1861.
- [7] Appay, Victor et al. „Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues“. In: *Cytometry Part A* 73A.11 (2008), S. 975–983.
- [8] Askenasy, E. M. und Askenasy, N. „Is autoimmune diabetes caused by aberrant immune activity or defective suppression of physiological self-reactivity?“ In: *Autoimmun Rev* 12.5 (2013), S. 633–637.
- [9] Asseman, C. et al. „An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation“. In: *J. Exp. Med.* 190.7 (1999), S. 995–1004.
- [10] Aumüller, Gerhard. *Anatomie*. Duale Reihe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007.

- [11] Awasthi, A., Murugaiyan, G. und Kuchroo, V. K. „Interplay between effector Th17 and regulatory T cells“. In: *J. Clin. Immunol.* 28.6 (2008), S. 660–670.
- [12] Azar, S. T. et al. „Type I (insulin-dependent) diabetes is a Th1- and Th2-mediated autoimmune disease“. In: *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6.3 (1999), S. 306–310.
- [13] BioLegend. *PE anti-human IFN γ R Beta chain Antibody*. 2012.
- [14] Böhm, B et al. „S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes“. In: *Bericht, Deutsche Diabetes Gesellschaft* (2011).
- [15] Bouma, G. und Strober, W. „The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease“. In: *Nature Reviews Immunology* 3.7 (2003), S. 521–533.
- [16] Bradshaw, E. M. et al. „Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells“. In: *J. Immunol.* 183.7 (2009), S. 4432–4439.
- [17] Brusko, T. und Atkinson, M. „Treg in type 1 diabetes“. In: *Cell Biochem. Biophys.* 48.2-3 (2007), S. 165–175.
- [18] Brusko, T. et al. „No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes“. In: *Diabetes* 56.3 (2007), S. 604–612.
- [19] Campbell, I. L. et al. „Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice“. In: *J. Clin. Invest.* 87 (1991).
- [20] Cao, X. et al. „Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance“. In: *Immunity* 27.4 (2007), S. 635–646.
- [21] Cederbom, L., Hall, H. und Ivars, F. „CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells“. In: *Eur. J. Immunol.* 30.6 (2000), S. 1538–1543.
- [22] Chatila, T. et al. „Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin“. In: *J. Immunol.* 143.4 (1989), S. 1283–1289.
- [23] Chen, W., Xie, A. und Chan, L. „Mechanistic basis of immunotherapies for type 1 diabetes mellitus“. In: *Transl Res* 161.4 (2013), S. 217–229.
- [24] Chen, Z. et al. „Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes“. In: *Arthritis Rheum.* 56 (2007).

- [25] Chetoui, N. et al. „Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway“. In: *Immunology* 130 (2010).
- [26] Cohn, L., Elias, J. A. und Chupp, G. L. „Asthma: mechanisms of disease persistence and progression“. In: *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004), S. 789–815.
- [27] Conti, H. R. et al. „Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis“. In: *J. Exp. Med.* 206.2 (2009), S. 299–311.
- [28] Danne, Thomas, Kordonouri, Olga und Lange, Karin. *Kompendium pädiatrische Diabetologie*. 2. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2016.
- [29] *Data Sheet PepTivator Candida albicans MP65 - research grade*. Miltenyi Biotec GmbH. Bergisch Gladbach, Deutschland.
- [30] Debray-Sachs, M. et al. „Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma“. In: *J. Autoimmun.* 4 (1991).
- [31] Du, W. et al. „TGF-beta signaling is required for the function of insulin-reactive T regulatory cells“. In: *J. Clin. Invest.* 116.5 (2006), S. 1360–1370.
- [32] ElEssawy, B. und Li, X. C. „Type 1 diabetes and T regulatory cells“. In: *Pharmacol. Res.* 98 (2015), S. 22–30.
- [33] Fantini, M. C. et al. „Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7“. In: *J. Immunol.* 172.9 (2004), S. 5149–5153.
- [34] Ferraro, A. et al. „Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes“. In: *Diabetes* 60.11 (2011), S. 2903–2913.
- [35] Ferreira, R. C. et al. „IL-21 production by CD4+ effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients“. In: *Diabetologia* 58 (2015).
- [36] Franceschi, Claudio, Bonafè, Massimiliano und Valensin, Silvana. „Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space“. In: *Vaccine* 18 (2000). ISSN: 0264-410X.
- [37] Garin, M. I. et al. „Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells“. In: *Blood* 109.5 (2007), S. 2058–2065.

- [38] Ghoreschi, K. et al. „Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling“. In: *Nature* 467.7318 (2010), S. 967–971.
- [39] Grakoui, A. „The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation“. In: *Science* 285.5425 (1999), S. 221–227.
- [40] Grant, C. R. et al. „Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and–yet–unanswered questions“. In: *Autoimmun Rev* 14.2 (2015), S. 105–116.
- [41] Gressner, Axel M. und Arndt, Torsten. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. ISBN: <http://id.crossref.org/isbn/978-3-642-12921-6>.
- [42] Grundmann, Ekkehard, Roessner, Albert und Bohle, Rainer M. *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. 11. Aufl. München: Urban & Fischer, 2008.
- [43] Gu, C., Wu, L. und Li, X. „IL-17 family: cytokines, receptors and signaling“. In: *Cytokine* 64.2 (2013), S. 477–485.
- [44] Han, Bobby Kwanghoon, Olsen, Nancy J. und Bottaro, Andrea. „The CD27-CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease“. In: *Seminars in Arthritis and Rheumatism* (2015).
- [45] Harrington, L. E. et al. „Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages“. In: *Nature Immunology* 6.11 (2005), S. 1123–1132.
- [46] Hartupee, J. et al. „IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization“. In: *J. Immunol.* 179.6 (2007), S. 4135–4141.
- [47] Hedman, M. et al. „Impaired CD4 and CD8 T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children“. In: *Clin. Exp. Immunol.* 153 (2008).
- [48] Herold, Gerd. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold, 2014.
- [49] Herrath, M. G. von und Oldstone, M. B. „Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus“. In: *J. Exp. Med.* 185.3 (1997), S. 531–539.
- [50] Hien, Peter, Claudi-Böhm, Simone und Böhm, Bernhard O. *Diabetes 1x1: Diagnostik, Therapie, Verlaufskontrolle*. Springer-Verlag, 2014.
- [51] Hofer, J. et al. „Elevated proportions of recent thymic emigrants in children and adolescents with type 1 diabetes“. In: *Rejuvenation Res* 12 (2009).

- [52] Honkanen, J. et al. „IL-17 immunity in human type 1 diabetes“. In: *J. Immunol.* 185.3 (2010), S. 1959–1967.
- [53] Huang, W. et al. „Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice“. In: *J. Infect. Dis.* 190.3 (2004), S. 624–631.
- [54] Hymowitz, S. G. et al. „IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding“. In: *EMBO J.* 20.19 (2001), S. 5332–5341.
- [55] Ivanov, I. I. et al. „The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells“. In: *Cell* 126.6 (2006), S. 1121–1133.
- [56] Kastelein, R. A., Hunter, C. A. und Cua, D. J. „Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation“. In: *Annual Review of Immunology* 25 (2007), S. 221–242.
- [57] Kaufmann, Stefan H. E. *Basiswissen Immunologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2014.
- [58] King, G. L. „The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications“. In: *J. Periodontol.* 79 (2008).
- [59] Koletzko, Berthold. *Kinder- und Jugendmedizin*. Berlin Heidelberg: Springer, 2013.
- [60] Korn, T. et al. „IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells“. In: *Nature* 448.7152 (2007), S. 484–487.
- [61] Kukreja, A. et al. „Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes“. In: *J. Clin. Invest.* 109.1 (2002), S. 131–140.
- [62] Langrish, C. L. et al. „IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation“. In: *J. Exp. Med.* 201.2 (2005), S. 233–240.
- [63] Li, M. O. und Flavell, R. A. „TGF- β , T-cell tolerance and immunotherapy of autoimmune diseases and cancer“. In: *Expert Rev Clin Immunol* 2.2 (2006), S. 257–265.
- [64] Liberal, R. et al. „Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease“. In: *IUBMB Life* 67.2 (2015), S. 88–97.
- [65] Lindley, S. et al. „Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes“. In: *Diabetes* 54.1 (2005), S. 92–99.

- [66] Liu, W. et al. „CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells“. In: *J. Exp. Med.* 203 (2006).
- [67] Long, S. A. et al. „Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects“. In: *Diabetes* 59 (2010).
- [68] Luczynski, W. et al. „Diminished expression of ICOS, GITR and CTLA-4 at the mRNA level in T regulatory cells of children with newly diagnosed type 1 diabetes“. In: *Acta Biochim. Pol.* 56 (2009).
- [69] Lüllmann-Rauch, Renate. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2009.
- [70] Luttmann, Werner et al. *Der Experimentator: Immunologie*. 4. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Science + Business Media, 2014. ISBN: <http://id.crossref.org/isbn/978-3-642-41899-0>.
- [71] MacKinnon, J. R., Knott, R. M. und Forrester, J. V. „Altered L-selectin expression in lymphocytes and increased adhesion to endothelium in patients with diabetic retinopathy“. In: *Br J Ophthalmol* 88 (2004).
- [72] Manel, N., Unutmaz, D. und Littman, D. R. „The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ mat“. In: *Nat. Immunol.* 9.6 (2008), S. 641–649.
- [73] Mannering, S. I. et al. „CD4+ T cell proliferation in response to GAD and proinsulin in healthy, pre-diabetic, and diabetic donors“. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1037 (2004).
- [74] Martin-Orozco, N. et al. „Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells“. In: *Eur. J. Immunol.* 39.1 (2009), S. 216–224.
- [75] Marwaha, A. K., Tan, S. und Dutz, J. P. „Targeting the IL-17/IFN- γ axis as a potential new clinical therapy for type 1 diabetes“. In: *Clin. Immunol.* 154.1 (2014), S. 84–89.
- [76] Marwaha, A. K. et al. „Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes“. In: *J. Immunol.* 185 (2010).
- [77] Miltenyi, S. et al. „High gradient magnetic cell separation with MACS“. In: *Cytometry* 11.2 (1990), S. 231–238.

- [78] Mito, N. et al. „Effect of obesity and insulin on immunity in non-insulin-dependent diabetes mellitus“. In: *Eur J Clin Nutr* 56 (2002).
- [79] Moniuszko, M. et al. „Decreased CD127 expression on CD4+ T-cells and elevated frequencies of CD4+CD25+CD127- T-cells in children with long-lasting type 1 diabetes“. In: *Clin. Dev. Immunol.* 2013 (2013).
- [80] Mosmann, Tim R, Li, Li und Sad, Subash. „Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns“. In: *Seminars in immunology*. Bd. 9. 2. Elsevier. 1997, S. 87–92.
- [81] Mosmann, Timothy R et al. „Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.“ In: *The Journal of Immunology* 136.7 (1986), S. 2348–2357.
- [82] Mosmann, TR und Coffman, RL. „TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties“. In: *Annual review of immunology* 7.1 (1989), S. 145–173.
- [83] Mueller, R., Krahl, T. und Sarvetnick, N. „Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice“. In: *J. Exp. Med.* 184.3 (1996), S. 1093–1099.
- [84] Nurieva, R. et al. „Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells“. In: *Nature* 448.7152 (2007), S. 480–483.
- [85] Pappu, B. P., Angkasekwinai, P. und Dong, C. „Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: new lessons learned from interleukin 17 family cytokines“. In: *Pharmacol. Ther.* 117.3 (2008), S. 374–384.
- [86] Patel, Parita und Macerollo, Allison. „Diabetes mellitus: diagnosis and screening“. In: *diabetes* 100 (2010), S. 13.
- [87] Piper, Wolfgang. *Innere Medizin*. 2. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer, 2013.
- [88] Pop, S. M. et al. „The type and frequency of immunoregulatory CD4+ T-cells govern the efficacy of antigen-specific immunotherapy in nonobese diabetic mice“. In: *Diabetes* 56 (2007).
- [89] Prelog, Martina. „Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity?“ In: *Autoimmunity Reviews* 5 (2006). ISSN: 1568-9972.
- [90] Puel, A. et al. „Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity“. In: *Science* 332.6025 (2011), S. 65–68.

- [91] Rapoport, M. J. et al. „Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice“. In: *J. Exp. Med.* 178.1 (1993), S. 87–99.
- [92] Rassow, Joachim et al. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2006.
- [93] Reinert-Hartwall, L. et al. „Th1/Th17 plasticity is a marker of advanced beta cell autoimmunity and impaired glucose tolerance in humans“. In: *J. Immunol.* 194 (2015).
- [94] Ren, X. et al. „Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells“. In: *Cell Death Differ.* 14.12 (2007), S. 2076–2084.
- [95] Riddell, S. R. und Greenberg, P. D. „The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells“. In: *J. Immunol. Methods* 128 (1990).
- [96] Rink, Lothar et al. *Immunologie für Einsteiger*. 2. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2015.
- [97] Roep, B. O. „The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure“. In: *Diabetologia* 46 (2003).
- [98] Rosa, M. de la et al. „Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function“. In: *Eur. J. Immunol.* 34.9 (2004), S. 2480–2488.
- [99] Rosenzweig, S. D. und Fleisher, T. A. „Laboratory evaluation for T-cell dysfunction“. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2013).
- [100] Ryba, M. et al. „Lower frequency of CD62L(high) and higher frequency of TNFR2(+) Tregs are associated with inflammatory conditions in type 1 diabetic patients“. In: *Mediators Inflamm.* 2011 (2011).
- [101] Ryba-Stanisławska, M. et al. „Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes“. In: *Hum. Immunol.* 74 (2013).
- [102] Sakaguchi, S. et al. „FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system“. In: *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010).
- [103] Sakaguchi, S. et al. „Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases“. In: *J. Immunol.* 155.3 (1995), S. 1151–1164.

- [104] Sallusto, F., Zielinski, C. E. und Lanzavecchia, A. „Human Th17 subsets“. In: *Eur. J. Immunol.* 42.9 (2012), S. 2215–2220.
- [105] Santarlasci, V. et al. „TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells“. In: *European Journal of Immunology* 39.1 (2009), S. 207–215.
- [106] Schlosser, M. et al. „Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies“. In: *Diabetologia* 53.12 (2010).
- [107] Schmitz, Sabine. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2011. ISBN: <http://id.crossref.org/isbn/978-3-8274-2573-7>.
- [108] Scholzen, T. und Gerdes, J. „The Ki-67 protein: from the known and the unknown“. In: *J. Cell. Physiol.* 182 (2000).
- [109] Schütt, Christine und Bröker, Barbara. *Grundwissen Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [110] Seissler, J et al. „Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease“. In: *Diabetologia* 41.8 (1998), S. 891–897.
- [111] Shao, Shiyong et al. „Th17 cells in type 1 diabetes“. In: *Cellular Immunology* 280.1 (2012), 16–21.
- [112] Sigma-Aldrich. *Datenblatt Brefeldin A*.
- [113] Sigma-Aldrich. *Datenblatt PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE*.
- [114] Smerdon, R. A. et al. „Increase in simultaneous coexpression of naive and memory lymphocyte markers at diagnosis of IDDM“. In: *Diabetes* 42 (1993).
- [115] Smith-Garvin, Jennifer E., Koretzky, Gary A. und Jordan, Martha S. „T Cell Activation“. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27.1 (2009), S. 591–619.
- [116] Speer, Christian P und Gahr, Manfred. *Pädiatrie*. 4. Aufl. Springer-Verlag, 2013.
- [117] Suerbaum, Sebastian et al. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.
- [118] Suntharalingam, G. et al. „Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412“. In: *N. Engl. J. Med.* 355.10 (2006), S. 1018–1028.

- [119] Tarbell, K. V. et al. „Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4⁺ CD25⁺ CD62L⁺ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice“. In: *J. Exp. Med.* 204 (2007).
- [120] Tesmer, L. A. et al. „Th17 cells in human disease“. In: *Immunol. Rev.* 223 (2008), S. 87–113.
- [121] Trickett, A. und Kwan, Y. L. „T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads“. In: *J. Immunol. Methods* 275 (2003).
- [122] Trinchieri, G. „Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control“. In: *J. Exp. Med.* 204 (2007).
- [123] Verheijen, R. et al. „Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase“. In: *J. Cell. Sci.* 92 (Pt 1) (1989).
- [124] Viglietta, V. et al. „Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis“. In: *J. Exp. Med.* 199.7 (2004), S. 971–979.
- [125] Volpe, E. et al. „A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses“. In: *Nat. Immunol.* 9.6 (2008), S. 650–657.
- [126] Voo, K. S. et al. „Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009).
- [127] Walker, L. S. „Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance“. In: *J. Autoimmun.* 45 (2013).
- [128] Walker, L. S. K. und Herrath, M. von. „CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes“. In: *Clinical & Experimental Immunology* 183.1 (2015), 16–29.
- [129] Wang, B. et al. „Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997).
- [130] Wildin, R. S. et al. „X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy“. In: *Nat. Genet.* 27.1 (2001), S. 18–20.
- [131] Wilson, N. J. et al. „Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells“. In: *Nature Immunology* 8.9 (2007), S. 950–957.

- [132] „World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects“. In: *JAMA* (2013).
- [133] Xiu, F. et al. „Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells“. In: *Int J Endocrinol* 2014 (2014).
- [134] Yan, H. et al. „Magnetic cell sorting and flow cytometry sorting methods for the isolation and function analysis of mouse CD4⁺ CD25⁺ Treg cells“. In: *J Zhejiang Univ Sci B* 10 (2009).
- [135] Yang, J. et al. „CD4⁺ T cells from type 1 diabetic and healthy subjects exhibit different thresholds of activation to a naturally processed proinsulin epitope“. In: *J. Autoimmun.* 31 (2008).
- [136] Yang, J. H. et al. „Natural Variation in Interleukin-2 Sensitivity Influences Regulatory T-Cell Frequency and Function in Individuals With Long-standing Type 1 Diabetes“. In: *Diabetes* 64 (2015).
- [137] Yang, L. et al. „IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T(H)17 cells“. In: *Nature* 454.7202 (2008), S. 350–352.
- [138] Yang, X. O. et al. „STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells“. In: *J. Biol. Chem.* 282.13 (2007), S. 9358–9363.
- [139] Yang, X. O. et al. „T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ “. In: *Immunity* 28.1 (2008), S. 29–39.
- [140] Zaccane, P. und Cooke, A. „Helminth mediated modulation of Type 1 diabetes (T1D)“. In: *International Journal for Parasitology* 43.3-4 (2013), S. 311–318.
- [141] Zhang, Y. et al. „Insulin promotes T cell recovery in a murine model of autoimmune myocarditis“. In: *Clin. Exp. Immunol.* 171 (2013).
- [142] Zhen, Y. et al. „Alterations of peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells in mice with STZ-induced diabetes“. In: *Cell. Mol. Immunol.* 9 (2012).
- [143] Zheng, S. G. et al. „IL-2 is essential for TGF- β to convert naive CD4⁺CD25⁻ cells to CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and for expansion of these cells“. In: *J. Immunol.* 178.4 (2007), S. 2018–2027.
- [144] Zielinski, C. E. et al. „Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β “. In: *Nature* 484.7395 (2012), S. 514–518.

- [145] Zimmerman, M. A. und Flores, S. C. „Autoimmune-mediated oxidative stress and endothelial dysfunction: implications of accelerated vascular injury in type I diabetes“. In: *J. Surg. Res.* 155 (2009).

Abbildungsverzeichnis

1	Darstellung der T-Zell-Subpopulationen, modifiziert nach Kaufmann, Stefan H.E. Basiswissen Immunologie. Springer-Verlag, 2014 S.79-81, Abb. 8.11-8.13	6
2	Darstellung der Insulin-Synthese modifiziert nach Rassow, J.; Deutzmann, R.; Netzker, R.; Hauser, K. Duale Reihe Biochemie, S.566 Georg Thieme Verlag, 2006	15
3	Phasenverteilung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll, Eigene Quelle	29
4	Darstellung einer Neubauer-Zählkammer, Eigene Quelle	30
5	Magnetische Zellseparation, Apparatur und Funktionsprinzip, modifiziert nach http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/manual-cell-separation/separators/minimacs-separator-and-starting-kit.aspx , Zugang am Mittwoch, 3. August 2016, 20:15:25 Uhr	33
6	Prinzip der FACS-Messung aus Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. Der Experimentator: Immunologie, S.75, Springer Science + Business Media, 2014	42
7	FSC- und SSC-Messung aus Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. Der Experimentator: Immunologie, S.77 Springer Science + Business Media, 2014	42
8	FACS Messung CFSE gefärbter Zellen nach Zellkultur, Eigene Quelle	46
9	Reinheit der CD4 ⁺ und CD45RA ⁺ CD27 ⁺ Zellfraktionen nach Isolation, Darstellung der FACS-Messung anhand von zwei Beispielen der Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und der Kontrollpatienten, Eigene Quelle	48
10	Anteil der Ki67 ⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und den Kontrollpatienten	50

11	Verteilung der CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und den Kontrollpatienten	56
12	Verteilung der CD25+FOXP3+ T-Zellen zwischen zwischen Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes (T1DM EM) und den Kontrollpatienten	56
13	Anteil der CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einem länger bestehendem Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten	57
14	Anteil der CD45+CD27+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	59
15	Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	59
16	Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL10+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	59
17	Verteilung der CD45+CD27- T-Zellen zwischen Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten	62
18	Verteilung der IL17+ T-Zellen zwischen Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten . .	63
19	Verteilung der CD45-CD27+IL17+ T-Zellen zwischen zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten	63
20	Verteilung der CD45+CD27+IL17+ T-Zellen zwischen zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten	64
21	Verteilung der CD45-CD27-IL17+ T-Zellen zwischen zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten	64
22	Verteilung der CD45-CD27+ T-Zellen zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	67
23	Verteilung der CD45+CD27- T-Zellen zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten	67
24	Verteilung der CD45+CD27+ T-Zellen zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten	67

25	Verteilung der Ki67+IL17+ T-Zellen zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten	68
26	Verteilung der Ki67+IFN γ + T-Zellen zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten	68
27	Verteilung der Ki67+IL17+IFN γ + T-Zellen zwischen den erwachsenen Diabetikern (T1DM) und den Kontrollpatienten	69
28	Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes (T1DM LZ) und den Kontrollpatienten	70
29	Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL10+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	71
30	Anteil der CD25+FOXP3+CD127-IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	72
31	Anteil der CD25+FOXP3+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	72
32	Anteil der CD25+FOXP3+CD127- T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	76
33	Anteil der CD25+FOXP3+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	76
34	Anteil der CD25+FOXP3+IL17+ T-Zellen an den Lymphozyten im Vergleich zwischen Erwachsenen Diabetikern (T1DM) und Kontrollpatienten	76
35	Steigerung der Proliferation (Index) im Vergleich bei den Erwachsenen	81
36	Steigerung der Proliferation (Index) im Vergleich zwischen den Kindern mit einem länger bestehenden Diabetes und den Kontrollpatienten	81
37	Steigerung der Proliferation (Index) im Vergleich zwischen den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes und den Kontrollpatienten	82

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Geräte	23
2	Verwendete Pufferlösungen	23
3	Verbrauchsmaterialien	24
4	Gebrauchsfertige Medien	24
5	Zell-Stimulation	25
6	Zellseparation	25
7	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	26
8	Verwendete Zytokine	26
9	Ein- und Ausschlusskriterien der für die Studie verwendeten erkrankten Probanden	28
10	Ein- und Ausschlusskriterien der für die Studie verwendeten Kontrollprobanden	28
11	Verwendete Zytokine und deren Konzentrationen in der proinflammatorischen Zellkultur	37
12	Verwendete Zytokine und deren Konzentrationen in der antiinflammatorischen Zellkultur	38
13	Zytokinmilieu für die Differenzierung in regulatorische T-Lymphozyten	39
14	Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper für die Oberflächenfärbung .	44
15	Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper für die Färbung intrazellulärer Moleküle	44
16	Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen nach Isolation bei den Kinder-Probanden	47
17	Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen nach MACS-Isolierung bei den erwachsenen Probanden	48
18	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kindern mit einer Erstmanifestation	54
19	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kinder-Kontrollprobanden	54

20	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den länger an Diabetes erkrankten Kindern	61
21	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den erwachsenen Diabetikern	66
22	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kinder mit einer Erstmanifestation eines Diabetes	74
23	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kinder mit einem länger bestehendem Diabetes	74
24	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den Kinder-Kontrollpatienten	75
25	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den erwachsenen Diabetikern	77
26	Vergleich zwischen der Stimulation mit dem <i>C. albicans</i> -Antigen und Antikörpern gegen CD3 und CD28 bei den erwachsenen Kontrollpatienten	78
27	Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen vor Treg-Induktion bei den Kindern	78
28	Reinheit der CD4+ und CD45RA+CD27+ Zellfraktionen vor Treg-Induktion bei den Erwachsenen	79
29	Reinheit der CD25+ T-Zellfraktionen vor Treg-Induktion bei den Erwachsenen und den Kindern	79
30	Suppressionsassays, Darstellung der Zellproliferation	80
31	Suppressionsassays, Vergleich der Index-Werte	80
32	Darstellung der Ergebnisse der Zellkultur im Vergleich zu den Ergebnissen unter IFN γ -Blockade und TGF β -Einfluss bei den Kindern mit einer Erstmanifestation eines Diabetes	84
33	Darstellung der Ergebnisse der Zellkultur im Vergleich zu den Ergebnissen unter IFN γ -Blockade und TGF β -Einfluss bei den Kindern mit einem länger bestehendem Diabetes	86
34	Darstellung der Ergebnisse der Zellkultur im Vergleich zu den Ergebnissen unter IFN γ -Blockade und TGF β -Einfluss bei den erwachsenen Diabetikern	89

41	Suppressionsassays, Darstellung der Zellproliferation	151
42	Suppressionsassays, Vergleich der Index-Werte	151

Danksagung

Mein Dank gilt allen voran Frau Prof. Dr. med. Prelog, die mir nicht nur die Möglichkeit zur Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit gegeben hat, sondern mir auch jederzeit mit ihrer wissenschaftlichen Erfahrung beratend und motivierend zur Seite stand.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. rer. nat. Giovanni Almanzar für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit im Labor, die Beratung und Hilfestellung bei der Planung der Versuche sowie die regelmäßige Kontrolle der Versuchsdurchführung.

Außerdem bedanke ich mich bei den im Labor tätigen Mitarbeiterinnen Frau Kerstin Höfner, Frau Barbara Ottensmeier, Frau Gabi Haase und Frau Angelika Will für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Ebenso danke ich den Ärzten der Kinderklinik der Universitätsklinik Würzburg für die Unterstützung bei der Gewinnung der Blutproben.

Den Patientinnen und Patienten gilt ebenso wie deren Eltern ein besonderer Dank für die Teilnahme an dieser Studie.

Ein außerordentlicher Dank gebührt meiner Frau Christina sowie meinen Eltern Ute und Georg für die immerwährende und kompromisslose Unterstützung bei dieser Arbeit wie im Leben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Benjamin Georg Heinz Zimmermann
Alter: 31 Jahre

Schule

08/1999 – 06/2006 Altes Gymnasium Oldenburg
Allgemeine Hochschulreife

Studium

11/2015 Erhalt der Approbation
11/2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 04/2009 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Studium der Humanmedizin

Oldenburg, 19.01.2018

Anhang

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente bei Stimulation in einem proinflammatorischen Zytokinmilieu mit aCD3/aCD28 dargestellt.

Kinder T1DM EM	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
IL17+	3,71 \pm 2,10	4,18	1,10 - 5,78
IFN γ +	12,85 \pm 5,28	15,58	7,05 - 17,82
IL17+IFN γ +	1,46 \pm 0,80	1,19	0,48 - 2,46
Ki67+	30,54 \pm 17,42	38,91	8,41 - 49,13
Ki67+IFN γ +	9,29 \pm 5,22	10,98	3,07 - 15,28
Ki67+IL17+	2,12 \pm 1,68	1,93	0,39 - 3,90
Ki67+IL17+IFN γ +	1,16 \pm 0,73	0,90	0,41 - 2,20
CD45RO-CD27+	61,94 \pm 15,20	58,37	42,20 - 82,08
CD45RO-CD27+IL17+	1,10 \pm 0,72	1,19	0,15 - 1,99
CD45RO+CD27+	30,46 \pm 14,58	33,06	11,28 - 49,51
CD45RO+CD27+IL17+	2,00 \pm 1,34	2,34	0,55 - 3,31
CD45RO+CD27-	4,71 \pm 1,08	5,17	3,52 - 5,95
CD45RO+CD27-IL17+	0,66 \pm 0,28	0,68	0,34 - 1,08
CD45RO-CD27-	2,89 \pm 1,13	2,62	1,93 - 4,77
CD45RO-CD27-IL17+	0,23 \pm 0,06	0,20	0,18 - 0,32
CD25+FOXP3+	42,87 \pm 11,01	47,54	27,63 - 53,72
CD25+FOXP3+CD127-	32,85 \pm 9,82	37,26	21,69 - 41,47
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,66 \pm 1,09	0,21	0,03 - 2,60
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,78 \pm 1,15	2,00	0,49 - 3,39
CD25+FOXP3+IL10+	1,47 \pm 2,31	0,54	0,19 - 5,57
CD25+FOXP3+IL17+	2,44 \pm 2,16	2,03	0,62 - 6,07
CD25+FOXP3+CD62L+	6,38 \pm 6,46	2,93	1,90 - 17,35
CD25+FOXP3+Ki67+	25,66 \pm 14,07	29,25	8,42 - 41,87
IFN γ R+	7,22 \pm 5,72	9,07	1,34 - 14,39

Kinder T1DM LZ	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
IL17+	2,08 \pm 1,61	1,88	0,36 - 4,72
IFN γ +	3,98 \pm 1,19	3,96	2,81 - 5,63
IL17+IFN γ +	0,51 \pm 0,31	0,54	0,07 - 0,83
Ki67+	13,36 \pm 6,93	17,21	4,73 - 20,29
Ki67+IFN γ +	1,99 \pm 0,92	1,44	1,31 - 3,40
Ki67+IL17+	1,27 \pm 0,94	1,24	0,10 - 2,19
Ki67+IL17+IFN γ +	0,31 \pm 0,20	0,31	0,01 - 0,52
CD45RO-CD27+	72,12 \pm 7,21	72,57	64,46 - 81,24
CD45RO-CD27+IL17+	0,94 \pm 0,91	0,67	0,16 - 2,51
CD45RO+CD27+	21,16 \pm 5,75	21,09	15,32 - 27,42
CD45RO+CD27+IL17+	1,03 \pm 0,71	1,08	0,17 - 2,00
CD45RO+CD27-	3,61 \pm 1,93	4,11	1,31 - 5,53
CD45RO+CD27-IL17+	0,21 \pm 0,11	0,23	0,05 - 0,34
CD45RO-CD27-	3,11 \pm 1,39	2,55	1,57 - 5,04
CD45RO-CD27-IL17+	0,16 \pm 0,15	0,13	0,05 - 0,42
CD25+FOXP3+	20,94 \pm 5,31	20,33	13,09 - 27,42
CD25+FOXP3+CD127-	13,72 \pm 6,35	11,21	6,19 - 21,53
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,07 \pm 0,06	0,03	0,01 - 0,14
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,31 \pm 0,26	0,38	0,03 - 0,59
CD25+FOXP3+IL10+	0,49 \pm 0,75	0,29	0,02 - 1,81
CD25+FOXP3+IL17+	2,18 \pm 2,27	1,82	0,27 - 5,91
CD25+FOXP3+CD62L+	5,90 \pm 2,14	5,29	3,62 - 9,39
CD25+FOXP3+Ki67+	7,55 \pm 5,18	5,54	2,83 - 13,81
IFN γ R+	2,63 \pm 2,11	1,22	0,87 - 5,04

Kinder Kontrolle	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
------------------	---------------------	--------	---------

IL17+	3,52 ± 3,59	2,26	0,55 - 8,96
IFN γ +	8,17 ± 7,76	5,02	1,33 - 18,32
IL17+IFN γ +	1,19 ± 1,44	0,27	0,10 - 3,11
Ki67+	16,72 ± 15,30	10,84	2,19 - 40,00
Ki67+IFN γ +	3,81 ± 4,64	0,86	0,06 - 9,29
Ki67+IL17+	1,66 ± 1,91	0,95	0,01 - 4,41
Ki67+IL17+IFN γ +	0,74 ± 0,99	0,11	0,00 - 2,12
CD45RO-CD27+	58,19 ± 20,19	63,91	26,37 - 80,62
CD45RO-CD27+IL17+	0,91 ± 1,10	0,5	0,19 - 2,82
CD45RO+CD27+	31,29 ± 17,00	28,4	9,81 - 55,87
CD45RO+CD27+IL17+	1,39 ± 1,28	1,18	0,07 - 2,76
CD45RO+CD27-	6,61 ± 3,28	6,87	2,85 - 11,62
CD45RO+CD27-IL17+	0,78 ± 0,92	0,16	0,11 - 2,07
CD45RO-CD27-	3,91 ± 1,79	4,32	1,66 - 6,13
CD45RO-CD27-IL17+	0,63 ± 0,80	0,33	0,10 - 2,03
CD25+FOXP3+	36,68 ± 17,32	36,83	15,07 - 60,64
CD25+FOXP3+CD127-	24,49 ± 9,90	22,98	10,97 - 38,41
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,13 ± 0,16	0,08	0,00 - 0,39
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,02 ± 0,94	0,83	0,10 - 2,35
CD25+FOXP3+IL10+	0,51 ± 0,76	0,25	0,03 - 1,85
CD25+FOXP3+IL17+	2,65 ± 2,00	1,98	0,26 - 5,09
CD25+FOXP3+CD62L+	8,47 ± 4,78	7,87	3,50 - 16,10
CD25+FOXP3+Ki67+	15,35 ± 12,97	13,29	5,36 - 37,09
IFN γ R+	3,87 ± 2,38	3,11	1,96 - 8,02

Erwachsene T1DM	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	3,01 ± 0,79	3,14	2,14 - 3,99
IFN γ +	15,36 ± 7,09	18,26	6,95 - 21,85
IL17+IFN γ +	1,30 ± 0,49	1,24	0,84 - 2,11
Ki67+	23,12 ± 22,82	22,86	0,84 - 58,21
Ki67+IFN γ +	7,65 ± 6,38	9,04	0,35 - 15,60
Ki67+IL17+	1,17 ± 0,89	1,58	0,10 - 2,18
Ki67+IL17+IFN γ +	0,78 ± 0,60	0,56	0,10 - 1,53
CD45RO-CD27+	46,08 ± 17,13	38,04	26,83 - 67,81
CD45RO-CD27+IL17+	0,44 ± 0,53	0,19	0,07 - 1,33
CD45RO+CD27+	41,97 ± 18,96	49,68	13,21 - 60,75
CD45RO+CD27+IL17+	1,40 ± 0,71	1,4	0,50 - 2,12
CD45RO+CD27-	8,57 ± 3,43	10	3,13 - 11,33
CD45RO+CD27-IL17+	1,08 ± 0,75	0,62	0,43 - 1,91
CD45RO-CD27-	3,38 ± 2,55	2,67	1,33 - 7,65
CD45RO-CD27-IL17+	0,25 ± 0,24	0,14	0,03 - 0,65
CD25+FOXP3+	44,91 ± 24,45	56,67	8,22 - 69,34
CD25+FOXP3+CD127-	34,70 ± 19,92	40,76	5,89 - 59,17
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,12 ± 0,09	0,09	0,00 - 0,23
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,56 ± 1,07	1,47	0,15 - 2,76
CD25+FOXP3+IL10+	0,39 ± 0,27	0,36	0,10 - 0,82
CD25+FOXP3+IL17+	1,90 ± 1,37	2,05	0,23 - 3,59
CD25+FOXP3+CD62L+	4,85 ± 3,10	4,68	0,23 - 8,36
CD25+FOXP3+Ki67+	15,24 ± 20,81	8,50	0,00 - 51,03
IFN γ R+	2,59 ± 1,14	1,84	1,77 - 4,34

Erwachsene Kontrolle	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	3,33 ± 3,47	1,14	0,62 - 7,15
IFN γ +	11,95 ± 10,46	6,01	3,17 - 23,65
IL17+IFN γ +	0,91 ± 0,94	0,41	0,27 - 2,49
Ki67+	12,57 ± 9,31	11,94	1,77 - 27,41
Ki67+IFN γ +	2,74 ± 2,42	1,96	1,09 - 6,99
Ki67+IL17+	1,18 ± 1,74	0,59	0,04 - 4,25
Ki67+IL17+IFN γ +	0,35 ± 0,22	0,42	0,04 - 0,62
CD45RO-CD27+	57,03 ± 28,43	63,63	9,77 - 81,60
CD45RO-CD27+IL17+	0,31 ± 0,27	0,19	0,07 - 0,73
CD45RO+CD27+	26,77 ± 11,30	28,39	12,06 - 42,06
CD45RO+CD27+IL17+	0,70 ± 0,19	0,73	0,44 - 0,89
CD45RO+CD27-	10,14 ± 16,55	3,35	1,47 - 39,70
CD45RO+CD27-IL17+	1,58 ± 2,21	0,13	0,02 - 5,03
CD45RO-CD27-	6,06 ± 7,80	4,25	0,05 - 19,57
CD45RO-CD27-IL17+	1,05 ± 1,40	0,14	0,00 - 3,11
CD25+FOXP3+	27,53 ± 11,15	28,83	16,97 - 43,86
CD25+FOXP3+CD127-	16,54 ± 12,94	9,12	7,60 - 38,10
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,01 ± 0,01	0	0,00 - 0,03
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,22 ± 0,15	0,28	0,05 - 0,36

CD25+FOXP3+IL10+	1,62 ± 3,18	0,31	0,02 - 7,30
CD25+FOXP3+IL17+	0,53 ± 0,29	0,42	0,30 - 1,02
CD25+FOXP3+CD62L+	9,58 ± 8,18	7,08	3,31 - 23,65
CD25+FOXP3+Ki67+	6,69 ± 4,02	7,58	1,04 - 12,06
IFNyR+	3,14 ± 1,99	2,84	0,46 - 5,97

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente bei Stimulation in einem proinflammatorischen Zytokinmilieu mit dem *C. albicans*-Antigen dargestellt.

Kinder T1DM EM	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	6,49 ± 2,44	5,82	3,59 - 9,40
IFNy+	4,80 ± 2,00	4,67	2,91 - 7,68
IL17+IFNy	2,07 ± 0,49	2,21	1,22 - 2,41
Ki67+	5,00 ± 5,87	2,91	1,54 - 15,45
Ki67+IFNy+	0,90 ± 0,36	0,71	0,54 - 1,40
Ki67+IL17+	1,23 ± 0,67	1,30	0,50 - 1,94
Ki67+IL17+IFNy+	0,75 ± 0,40	0,49	0,45 - 1,32
CD45RO-CD27+	84,08 ± 7,18	85,56	75,35 - 91,99
CD45RO-CD27+IL17+	3,68 ± 2,40	2,82	0,68 - 6,39
CD45RO+CD27+	8,16 ± 3,73	8,01	4,64 - 13,83
CD45RO+CD27+IL17+	1,55 ± 0,58	1,47	0,95 - 2,49
CD45RO+CD27-	4,99 ± 3,18	4,01	1,88 - 10,17
CD45RO+CD27-IL17+	1,02 ± 0,27	0,92	0,81 - 1,45
CD45RO-CD27-	2,78 ± 1,48	2,57	1,12 - 5,19
CD45RO-CD27-IL17+	0,47 ± 0,26	0,49	0,18 - 0,73
CD25+FOXP3+	9,31 ± 2,48	8,75	6,93 - 12,10
CD25+FOXP3+CD127-	4,00 ± 0,90	3,79	2,78 - 4,91
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,03 ± 0,04	0,02	0,00 - 0,10
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,19 ± 0,14	0,13	0,06 - 0,36
CD25+FOXP3+IL10+	0,83 ± 0,52	0,98	0,26 - 1,32
CD25+FOXP3+IL17+	3,36 ± 4,69	1,39	0,72 - 11,72
CD25+FOXP3+CD62L+	0,54 ± 0,21	0,45	0,29 - 0,79
CD25+FOXP3+Ki67+	1,04 ± 0,58	0,87	0,56 - 2,01
IFNyR+	2,70 ± 2,08	1,23	1,18 - 5,39
Kinder T1DM LZ	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	1,90 ± 0,59	1,61	1,30 - 2,67
IFNy+	2,24 ± 1,05	2,2	1,04 - 3,70
IL17+IFNy	1,00 ± 0,49	0,95	0,48 - 1,62
Ki67+	6,95 ± 9,02	3,04	1,11 - 22,79
Ki67+IFNy+	0,68 ± 0,49	0,44	0,25 - 1,22
Ki67+IL17+	0,61 ± 0,40	0,5	0,25 - 1,23
Ki67+IL17+IFNy+	0,43 ± 0,30	0,4	0,18 - 0,92
CD45RO-CD27+	85,49 ± 6,39	88,99	75,69 - 90,80
CD45RO-CD27+IL17+	0,84 ± 0,22	0,92	0,49 - 1,06
CD45RO+CD27+	5,76 ± 3,09	6,34	2,74 - 10,12
CD45RO+CD27+IL17+	0,53 ± 0,25	0,64	0,22 - 0,82
CD45RO+CD27-	3,91 ± 2,88	3,2	1,38 - 8,84
CD45RO+CD27-IL17+	0,48 ± 0,40	0,41	0,14 - 1,16
CD45RO-CD27-	4,84 ± 2,09	5,1	1,47 - 7,22
CD45RO-CD27-IL17+	0,17 ± 0,07	0,21	0,07 - 0,23
CD25+FOXP3+	5,34 ± 2,21	4,33	3,62 - 8,93
CD25+FOXP3+CD127-	2,21 ± 0,62	1,99	1,42 - 3,01
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,01 ± 0,01	0,00	0,00 - 0,02
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,03 ± 0,03	0,02	0,00 - 0,08
CD25+FOXP3+IL10+	0,43 ± 0,25	0,51	0,12 - 0,69
CD25+FOXP3+IL17+	0,57 ± 0,46	0,49	0,12 - 1,33
CD25+FOXP3+CD62L+	0,67 ± 0,46	0,47	0,31 - 1,43
CD25+FOXP3+Ki67+	0,47 ± 0,16	0,44	0,31 - 0,72
IFNyR+	2,47 ± 1,52	2,07	1,02 - 4,36
Kinder Kontrolle	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	4,75 ± 2,67	4,41	1,46 - 8,81
IFNy+	4,59 ± 4,33	3,4	1,83 - 12,18
IL17+IFNy	1,32 ± 0,73	1,36	0,40 - 2,30

Ki67+	2,11 ± 1,35	1,95	0,72 - 3,89
Ki67+IFNy+	0,86 ± 0,75	0,72	0,18 - 1,97
Ki67+IL17+	1,03 ± 0,81	0,83	0,29 - 2,27
Ki67+IL17+IFNy+	0,60 ± 0,43	0,68	0,17 - 1,18
CD45RO-CD27+	78,22 ± 9,08	80,17	62,60 - 85,64
CD45RO-CD27+IL17+	2,66 ± 2,30	1,62	0,72 - 6,43
CD45RO+CD27+	8,50 ± 1,78	9,12	6,14 - 10,19
CD45RO+CD27+IL17+	0,97 ± 0,31	1,04	0,57 - 1,31
CD45RO+CD27-	8,77 ± 5,67	6,99	3,92 - 18,54
CD45RO+CD27-IL17+	0,86 ± 0,58	0,95	0,15 - 1,68
CD45RO-CD27-	4,51 ± 2,92	3,37	1,32 - 8,94
CD45RO-CD27-IL17+	0,67 ± 0,36	0,67	0,16 - 1,09
CD25+FOXP3+	6,62 ± 2,87	6,64	3,03 - 11,00
CD25+FOXP3+CD127-	2,93 ± 1,33	2,63	1,32 - 4,86
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,02 ± 0,03	0,01	0,00 - 0,07
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,10 ± 0,07	0,08	0,01 - 0,17
CD25+FOXP3+IL10+	0,58 ± 0,50	0,34	0,18 - 1,43
CD25+FOXP3+IL17+	1,13 ± 0,78	0,85	0,24 - 2,27
CD25+FOXP3+CD62L+	0,60 ± 0,25	0,58	0,32 - 0,97
CD25+FOXP3+Ki67+	0,84 ± 0,56	0,72	0,29 - 1,76
IFNyR+	3,08 ± 1,96	1,90	1,30 - 5,42

Erwachsene T1DM	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	3,08 ± 1,67	2,61	1,62 - 5,90
IFNy+	5,02 ± 3,39	5,44	1,36 - 9,94
IL17+IFNy	1,47 ± 1,28	1,17	0,34 - 3,67
Ki67+	2,66 ± 1,76	3,13	0,27 - 4,81
Ki67+IFNy+	0,96 ± 0,80	0,66	0,07 - 1,85
Ki67+IL17+	0,69 ± 0,51	0,55	0,09 - 1,40
Ki67+IL17+IFNy+	0,68 ± 0,55	0,48	0,07 - 1,44
CD45RO-CD27+	73,32 ± 9,59	73,24	59,49 - 85,73
CD45RO-CD27+IL17+	0,90 ± 0,68	0,66	0,42 - 2,09
CD45RO+CD27+	14,32 ± 6,57	15,83	7,79 - 23,65
CD45RO+CD27+IL17+	0,93 ± 0,75	0,77	0,32 - 2,18
CD45RO+CD27-	8,02 ± 2,95	8,36	3,38 - 11,62
CD45RO+CD27-IL17+	0,92 ± 0,72	0,72	0,18 - 2,10
CD45RO-CD27-	4,34 ± 1,67	4,66	2,63 - 6,47
CD45RO-CD27-IL17+	0,33 ± 0,27	0,22	0,11 - 0,80
CD25+FOXP3+	6,65 ± 3,49	7,73	2,01 - 10,68
CD25+FOXP3+CD127-	2,96 ± 1,47	3,26	0,50 - 4,22
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,04 ± 0,04	0,04	0,01 - 0,11
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,16 ± 0,10	0,11	0,09 - 0,32
CD25+FOXP3+IL10+	0,71 ± 0,61	0,70	0,01 - 1,47
CD25+FOXP3+IL17+	0,63 ± 0,53	0,47	0,15 - 1,55
CD25+FOXP3+CD62L+	0,52 ± 0,18	0,57	0,21 - 0,65
CD25+FOXP3+Ki67+	0,59 ± 0,50	0,39	0,02 - 1,22
IFNyR+	2,19 ± 1,45	1,44	0,69 - 3,98

Erwachsene Kontrolle	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	3,65 ± 4,49	1,59	1,04 - 10,37
IFNy+	2,72 ± 2,51	1,57	1,27 - 6,48
IL17+IFNy	1,04 ± 1,22	0,72	0,00 - 3,15
Ki67+	2,54 ± 1,86	2,995	0,12 - 4,04
Ki67+IFNy+	0,15 ± 0,19	0,05	0,00 - 0,38
Ki67+IL17+	0,21 ± 0,22	0,21	0,00 - 0,42
Ki67+IL17+IFNy+	0,14 ± 0,17	0,05	0,00 - 0,34
CD45RO-CD27+	89,02 ± 9,76	93,26	74,44 - 95,13
CD45RO-CD27+IL17+	0,57 ± 0,21	0,64	0,27 - 0,73
CD45RO+CD27+	6,19 ± 3,70	4,775	3,55 - 11,67
CD45RO+CD27+IL17+	0,58 ± 0,31	0,595	0,19 - 0,95
CD45RO+CD27-	1,78 ± 2,04	0,935	0,44 - 4,81
CD45RO+CD27-IL17+	1,18 ± 2,06	0,22	0,02 - 4,26
CD45RO-CD27-	3,00 ± 4,08	1,18	0,58 - 9,07
CD45RO-CD27-IL17+	1,44 ± 2,75	0,07	0,04 - 5,56
CD25+FOXP3+	5,56 ± 6,05	3,24	1,27 - 14,48
CD25+FOXP3+CD127-	2,05 ± 2,03	1,55	0,33 - 4,78
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,04 ± 0,07	0,01	0,00 - 0,15
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,09 ± 0,14	0,02	0,00 - 0,30
CD25+FOXP3+IL10+	0,82 ± 1,35	0,19	0,07 - 2,84
CD25+FOXP3+IL17+	0,52 ± 0,19	0,47	0,35 - 0,78
CD25+FOXP3+CD62L+	1,56 ± 2,30	0,48	0,28 - 5,00

CD25+FOXP3+Ki67+	0,31 ± 0,33	0,23	0,00 - 0,78
IFN γ R+	5,03 ± 5,12	3,69	0,40 - 12,34

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente bei Blockade von IFN γ dargestellt.

Kinder T1DM EM	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	2,82 ± 1,59	2,60	0,66 - 5,04
IFN γ +	10,09 ± 3,49	11,91	4,93 - 12,92
IL17+IFN γ	1,13 ± 0,60	1,06	0,28 - 1,85
Ki67+	26,13 ± 14,72	30,40	8,43 - 41,81
Ki67+IFN γ +	6,95 ± 3,72	7,36	2,12 - 11,38
Ki67+IL17+	1,57 ± 1,04	1,25	0,37 - 3,17
Ki67+IL17+IFN γ +	1,11 ± 0,86	0,68	0,18 - 2,19
CD45RO-CD27+	66,72 ± 15,58	61,54	46,72 - 86,15
CD45RO-CD27+IL17+	0,71 ± 0,53	0,63	0,07 - 1,55
CD45RO+CD27+	27,33 ± 14,99	32,58	9,05 - 46,66
CD45RO+CD27+IL17+	1,80 ± 1,14	1,78	0,29 - 3,51
CD45RO+CD27-	3,66 ± 0,90	4,21	2,30 - 4,37
CD45RO+CD27-IL17+	0,46 ± 0,20	0,43	0,23 - 0,74
CD45RO-CD27-	2,30 ± 0,74	2,23	1,62 - 3,44
CD45RO-CD27-IL17+	0,19 ± 0,08	0,22	0,11 - 0,28
CD25+FOXP3+	38,83 ± 11,65	44,82	21,10 - 49,86
CD25+FOXP3+CD127-	28,45 ± 9,81	28,14	16,35 - 42,88
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,15 ± 0,18	0,07	0,02 - 0,47
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,15 ± 1,37	0,41	0,22 - 3,47
CD25+FOXP3+IL10+	1,05 ± 1,65	0,34	0,24 - 4,00
CD25+FOXP3+IL17+	2,45 ± 1,72	1,96	1,14 - 5,31
CD25+FOXP3+CD62L+	6,26 ± 6,93	2,75	1,97 - 18,43
CD25+FOXP3+Ki67+	24,02 ± 12,20	28,84	7,98 - 36,24
IFN γ R+	6,67 ± 4,50	5,25	1,77 - 12,19

Kinder T1DM LZ	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	2,44 ± 2,85	1,06	0,80 - 7,45
IFN γ +	4,78 ± 4,11	3,17	1,87 - 11,98
IL17+IFN γ	1,62 ± 2,76	0,52	0,20 - 6,55
Ki67+	11,38 ± 3,61	11,25	6,95 - 16,53
Ki67+IFN γ +	1,94 ± 1,73	1,39	0,88 - 5,00
Ki67+IL17+	1,26 ± 1,23	0,82	0,27 - 3,29
Ki67+IL17+IFN γ +	0,72 ± 1,20	0,21	0,12 - 2,87
CD45RO-CD27+	75,98 ± 6,23	74,57	68,91 - 85,07
CD45RO-CD27+IL17+	1,39 ± 1,92	0,49	0,23 - 4,76
CD45RO+CD27+	17,37 ± 4,43	18,18	10,59 - 22,72
CD45RO+CD27+IL17+	0,80 ± 0,58	0,7	0,31 - 1,73
CD45RO+CD27-	3,69 ± 2,22	4,36	1,00 - 5,88
CD45RO+CD27-IL17+	0,37 ± 0,42	0,21	0,05 - 1,11
CD45RO-CD27-	2,96 ± 1,08	3,15	1,25 - 4,21
CD45RO-CD27-IL17+	0,16 ± 0,16	0,09	0,02 - 0,36
CD25+FOXP3+	23,47 ± 4,95	24,58	15,22 - 28,52
CD25+FOXP3+CD127-	16,02 ± 5,33	17,78	8,54 - 21,55
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,09 ± 0,13	0,06	0,00 - 0,31
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,55 ± 0,45	0,77	0,06 - 1,01
CD25+FOXP3+IL10+	0,24 ± 0,22	0,25	0,02 - 0,58
CD25+FOXP3+IL17+	1,89 ± 1,37	2,41	0,41 - 3,57
CD25+FOXP3+CD62L+	6,29 ± 2,42	6,09	3,47 - 9,39
CD25+FOXP3+Ki67+	7,62 ± 3,80	7,17	4,12 - 13,72
IFN γ R+	7,61 ± 5,89	5,69	1,41 - 15,10

Kinder Kontrolle	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	3,71 ± 3,84	1,31	0,59 - 9,28
IFN γ +	8,25 ± 7,85	3,56	1,88 - 17,78
IL17+IFN γ	1,33 ± 1,72	0,15	0,05 - 3,58
Ki67+	20,48 ± 13,27	21,34	6,71 - 34,57
Ki67+IFN γ +	4,61 ± 5,46	0,95	0,14 - 10,73

Ki67+IL17+	1,88 ± 2,02	0,67	0,13 - 4,58
Ki67+IL17+IFNy+	0,95 ± 1,26	0,04	0,02 - 2,49
CD45RO-CD27+	66,48 ± 15,44	67,97	41,68 - 79,97
CD45RO-CD27+IL17+	0,93 ± 0,92	0,56	0,32 - 2,55
CD45RO+CD27+	23,85 ± 11,25	25,26	11,96 - 40,80
CD45RO+CD27+IL17+	1,33 ± 1,40	0,43	0,21 - 3,13
CD45RO+CD27-	6,34 ± 3,56	5,37	3,53 - 12,34
CD45RO+CD27-IL17+	0,93 ± 1,08	0,28	0,10 - 2,65
CD45RO-CD27-	3,33 ± 1,62	3,99	1,11 - 5,18
CD45RO-CD27-IL17+	0,72 ± 0,90	0,32	0,08 - 2,26
CD25+FOXP3+	32,34 ± 18,80	21,56	15,33 - 56,72
CD25+FOXP3+CD127-	21,55 ± 12,06	18,11	8,93 - 38,54
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,27 ± 0,43	0,04	0,01 - 1,01
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,87 ± 2,20	0,62	0,16 - 5,25
CD25+FOXP3+IL10+	1,03 ± 1,54	0,15	0,05 - 3,64
CD25+FOXP3+IL17+	2,43 ± 2,58	1,07	0,22 - 6,32
CD25+FOXP3+CD62L+	7,21 ± 4,65	5,91	4,08 - 15,41
CD25+FOXP3+Ki67+	11,85 ± 9,53	11,06	3,58 - 27,19
IFNyR+	5,59 ± 2,62	5,78	2,91 - 8,63

Erwachsene T1DM	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	3,35 ± 1,57	2,79	1,67 - 5,71
IFNy+	13,52 ± 8,03	18,52	4,13 - 19,81
IL17+IFNy	1,38 ± 0,58	1,55	0,67 - 2,00
Ki67+	22,57 ± 23,36	19,73	1,93 - 57,95
Ki67+IFNy+	7,32 ± 6,88	7,98	0,39 - 16,25
Ki67+IL17+	1,73 ± 1,60	1,87	0,20 - 4,06
Ki67+IL17+IFNy+	0,97 ± 0,78	1,17	0,18 - 2,01
CD45RO-CD27+	51,59 ± 19,01	44,07	29,05 - 74,16
CD45RO-CD27+IL17+	0,45 ± 0,46	0,4	0,08 - 1,21
CD45RO+CD27+	36,84 ± 18,23	43,14	10,47 - 54,91
CD45RO+CD27+IL17+	1,40 ± 0,84	1,35	0,26 - 2,57
CD45RO+CD27-	8,56 ± 4,47	8,4	2,61 - 14,80
CD45RO+CD27-IL17+	1,45 ± 1,37	0,72	0,29 - 3,44
CD45RO-CD27-	3,01 ± 2,30	2,63	1,23 - 6,97
CD45RO-CD27-IL17+	0,18 ± 0,16	0,12	0,07 - 0,46
CD25+FOXP3+	40,80 ± 24,03	50,95	6,08 - 67,43
CD25+FOXP3+CD127-	31,12 ± 18,41	36,57	4,69 - 53,91
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,27 ± 0,34	0,18	0,00 - 0,86
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,64 ± 1,56	0,85	0,09 - 3,50
CD25+FOXP3+IL10+	0,65 ± 0,77	0,52	0,02 - 1,97
CD25+FOXP3+IL17+	2,38 ± 2,52	1,28	0,24 - 6,57
CD25+FOXP3+CD62L+	4,90 ± 2,75	5,75	0,17 - 7,22
CD25+FOXP3+Ki67+	17,65 ± 22,25	11,79	0,06 - 55,44
IFNyR+	4,92 ± 1,93	5,00	2,38 - 7,44

Erwachsene Kontrolle	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	1,59 ± 1,66	1,46	0,00 - 4,34
IFNy+	11,22 ± 12,84	4,44	0,00 - 31,81
IL17+IFNy	0,57 ± 0,56	0,4	0,00 - 1,47
Ki67+	10,79 ± 11,64	11,15	0,00 - 28,76
Ki67+IFNy+	2,37 ± 2,25	2,52	0,00 - 5,62
Ki67+IL17+	0,96 ± 1,47	0,31	0,00 - 3,49
Ki67+IL17+IFNy+	0,66 ± 0,91	0,09	0,00 - 2,04
CD45RO-CD27+	48,06 ± 37,46	63,86	0,00 - 81,51
CD45RO-CD27+IL17+	0,43 ± 0,60	0,18	0,00 - 1,48
CD45RO+CD27+	19,73 ± 13,63	18,92	0,00 - 33,88
CD45RO+CD27+IL17+	1,28 ± 1,56	0,49	0,00 - 3,83
CD45RO+CD27-	8,49 ± 16,05	1,63	0,00 - 37,17
CD45RO+CD27-IL17+	0,20 ± 0,23	0,17	0,00 - 0,58
CD45RO-CD27-	3,72 ± 6,59	0,9	0,00 - 15,40
CD45RO-CD27-IL17+	0,13 ± 0,13	0,12	0,00 - 0,31
CD25+FOXP3+	25,85 ± 10,79	23,65	16,41 - 41,93
CD25+FOXP3+CD127-	17,50 ± 11,40	17,27	7,13 - 35,48
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,01 ± 0,01	0,01	0,00 - 0,03
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,33 ± 0,29	0,35	0,03 - 0,64
CD25+FOXP3+IL10+	0,08 ± 0,05	0,07	0,03 - 0,16
CD25+FOXP3+IL17+	1,94 ± 2,94	0,67	0,31 - 7,18
CD25+FOXP3+CD62L+	7,38 ± 7,71	4,45	1,53 - 20,38
CD25+FOXP3+Ki67+	6,34 ± 4,51	6,96	0,88 - 12,72
IFNyR+	4,22 ± 2,51	4,83	0,42 - 7,11

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente bei Zugabe von TGF β dargestellt.

Kinder T1DM EM	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
IL17+	2,55 \pm 0,96	2,39	1,29 - 3,73
IFNy+	4,48 \pm 1,88	4,04	2,53 - 7,61
IL17+IFNy	0,76 \pm 0,43	0,81	0,27 - 1,31
Ki67+	28,00 \pm 17,64	24,60	7,56 - 55,47
Ki67+IFNy+	2,03 \pm 0,41	1,97	1,44 - 2,46
Ki67+IL17+	1,34 \pm 0,63	1,27	0,74 - 2,29
Ki67+IL17+IFNy+	0,61 \pm 0,41	0,53	0,22 - 1,19
CD45RO-CD27+	68,01 \pm 11,68	65,51	53,65 - 83,58
CD45RO-CD27+IL17+	0,76 \pm 0,34	0,97	0,31 - 1,07
CD45RO+CD27+	24,39 \pm 11,82	27,58	6,63 - 38,95
CD45RO+CD27+IL17+	1,40 \pm 0,92	0,85	0,60 - 2,59
CD45RO+CD27-	4,11 \pm 1,33	4,09	2,36 - 5,71
CD45RO+CD27-IL17+	0,61 \pm 0,22	0,57	0,32 - 0,83
CD45RO-CD27-	3,49 \pm 1,92	4,06	1,15 - 5,69
CD45RO-CD27-IL17+	0,20 \pm 0,11	0,16	0,09 - 0,34
CD25+FOXP3+	44,35 \pm 12,54	45,55	27,64 - 62,18
CD25+FOXP3+CD127-	36,61 \pm 13,53	33,50	21,96 - 58,70
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,75 \pm 1,15	0,22	0,08 - 2,79
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	2,57 \pm 1,74	1,99	0,61 - 4,83
CD25+FOXP3+IL10+	1,49 \pm 1,94	0,80	0,42 - 4,95
CD25+FOXP3+IL17+	3,12 \pm 2,83	1,31	1,06 - 7,52
CD25+FOXP3+CD62L+	6,01 \pm 9,92	1,42	0,98 - 23,69
CD25+FOXP3+Ki67+	28,79 \pm 16,30	32,08	7,92 - 51,43
IFNyR+	8,88 \pm 6,84	9,45	2,26 - 19,34

Kinder T1DM LZ	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
IL17+	1,54 \pm 1,20	1,24	0,41 - 3,50
IFNy+	3,06 \pm 1,14	3,41	1,20 - 4,05
IL17+IFNy	0,55 \pm 0,62	0,19	0,07 - 1,43
Ki67+	14,62 \pm 8,48	13,03	7,10 - 28,51
Ki67+IFNy+	1,41 \pm 0,88	1,22	0,24 - 2,55
Ki67+IL17+	0,81 \pm 0,83	0,41	0,25 - 2,26
Ki67+IL17+IFNy+	0,29 \pm 0,31	0,12	0,03 - 0,71
CD45RO-CD27+	72,37 \pm 5,04	71,48	66,93 - 80,65
CD45RO-CD27+IL17+	0,69 \pm 0,57	0,37	0,15 - 1,43
CD45RO+CD27+	20,33 \pm 4,64	19,31	16,40 - 27,57
CD45RO+CD27+IL17+	0,62 \pm 0,58	0,43	0,26 - 1,65
CD45RO+CD27-	4,13 \pm 2,72	4,66	1,50 - 8,14
CD45RO+CD27-IL17+	0,22 \pm 0,15	0,17	0,09 - 0,40
CD45RO-CD27-	3,17 \pm 1,13	3,84	1,45 - 4,09
CD45RO-CD27-IL17+	0,12 \pm 0,08	0,07	0,04 - 0,22
CD25+FOXP3+	28,72 \pm 8,63	30,32	15,53 - 38,58
CD25+FOXP3+CD127-	20,65 \pm 7,04	23,45	13,09 - 28,53
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,19 \pm 0,19	0,2	0,01 - 0,46
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,10 \pm 1,08	1,01	0,06 - 2,69
CD25+FOXP3+IL10+	0,68 \pm 0,62	0,82	0,03 - 1,36
CD25+FOXP3+IL17+	1,70 \pm 1,76	0,76	0,31 - 4,33
CD25+FOXP3+CD62L+	7,06 \pm 2,26	6,03	5,11 - 10,38
CD25+FOXP3+Ki67+	7,63 \pm 2,70	7,3	3,83 - 11,23
IFNyR+	12,70 \pm 10,90	6,56	5,57 - 31,01

Kinder Kontrolle	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
IL17+	5,70 \pm 7,35	1,68	0,64 - 18,05
IFNy+	6,09 \pm 6,58	2,02	1,12 - 16,03
IL17+IFNy	1,34 \pm 1,82	0,07	0,05 - 3,92
Ki67+	18,95 \pm 14,14	14,41	5,17 - 35,40
Ki67+IFNy+	2,40 \pm 3,19	0,21	0,07 - 6,81
Ki67+IL17+	2,96 \pm 4,29	0,44	0,07 - 10,16
Ki67+IL17+IFNy+	0,88 \pm 1,23	0,01	0,01 - 2,58

CD45RO-CD27+	60,85 ± 16,20	68,99	36,78 - 77,08
CD45RO-CD27+IL17+	1,20 ± 1,51	0,71	0,18 - 3,87
CD45RO+CD27+	25,02 ± 10,23	21,23	15,21 - 37,37
CD45RO+CD27+IL17+	2,29 ± 3,31	0,58	0,15 - 8,01
CD45RO+CD27-	9,36 ± 5,52	8,65	4,44 - 18,49
CD45RO+CD27-IL17+	1,60 ± 1,92	0,31	0,15 - 4,11
CD45RO-CD27-	4,77 ± 2,18	4,58	1,63 - 7,36
CD45RO-CD27-IL17+	0,80 ± 1,20	0,37	0,09 - 2,92
CD25+FOXP3+	35,58 ± 17,49	26,68	16,94 - 54,51
CD25+FOXP3+CD127-	28,25 ± 13,39	22,42	12,34 - 42,77
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,33 ± 0,35	0,32	0,02 - 0,87
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	2,60 ± 2,24	2,14	0,48 - 5,85
CD25+FOXP3+IL10+	0,86 ± 1,03	0,63	0,05 - 2,58
CD25+FOXP3+IL17+	3,60 ± 3,25	1,73	0,60 - 7,48
CD25+FOXP3+CD62L+	8,22 ± 6,14	8,18	1,55 - 17,94
CD25+FOXP3+Ki67+	16,74 ± 12,34	13,96	5,07 - 37,32
IFNyR+	9,87 ± 8,42	6,26	4,64 - 24,60

Erwachsene T1DM	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	4,18 ± 1,99	4,57	1,34 - 6,17
IFNy+	8,23 ± 2,33	8,75	4,57 - 10,33
IL17+IFNy	1,45 ± 0,48	1,33	0,90 - 2,20
Ki67+	20,84 ± 22,17	21,17	1,41 - 56,52
Ki67+IFNy+	2,73 ± 2,19	2,86	0,31 - 6,09
Ki67+IL17+	1,85 ± 1,65	1,76	0,20 - 4,37
Ki67+IL17+IFNy+	0,80 ± 0,43	0,95	0,15 - 1,21
CD45RO-CD27+	51,02 ± 15,91	48,1	28,02 - 70,00
CD45RO-CD27+IL17+	0,53 ± 0,67	0,21	0,18 - 1,73
CD45RO+CD27+	26,32 ± 10,12	29,65	10,21 - 35,24
CD45RO+CD27+IL17+	1,38 ± 0,72	1,5	0,18 - 2,09
CD45RO+CD27-	16,81 ± 9,94	12,94	8,89 - 33,72
CD45RO+CD27-IL17+	2,16 ± 1,59	1,64	0,53 - 4,15
CD45RO-CD27-	5,85 ± 1,79	4,99	4,08 - 8,56
CD45RO-CD27-IL17+	0,25 ± 0,15	0,23	0,09 - 0,48
CD25+FOXP3+	39,23 ± 24,23	43,46	2,87 - 68,20
CD25+FOXP3+CD127-	32,83 ± 22,00	32,95	1,61 - 61,89
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,13 ± 0,13	0,10	0,00 - 0,35
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,72 ± 1,44	1,31	0,06 - 3,42
CD25+FOXP3+IL10+	0,38 ± 0,28	0,33	0,06 - 0,69
CD25+FOXP3+IL17+	2,90 ± 2,04	4,31	0,40 - 4,52
CD25+FOXP3+CD62L+	2,31 ± 1,27	2,86	0,19 - 3,31
CD25+FOXP3+Ki67+	16,77 ± 18,98	16,82	0,03 - 46,98
IFNyR+	10,46 ± 5,13	11,81	1,59 - 14,35

Erwachsene Kontrolle	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
IL17+	1,52 ± 1,04	1,39	0,57 - 3,27
IFNy+	3,79 ± 2,42	3,19	1,46 - 7,25
IL17+IFNy	0,52 ± 0,42	0,36	0,21 - 1,23
Ki67+	7,81 ± 6,97	6,85	0,43 - 17,72
Ki67+IFNy+	0,67 ± 0,65	0,56	0,14 - 1,76
Ki67+IL17+	0,50 ± 0,43	0,62	0,00 - 0,91
Ki67+IL17+IFNy+	0,18 ± 0,23	0,07	0,00 - 0,57
CD45RO-CD27+	45,02 ± 42,18	64	0,00 - 90,00
CD45RO-CD27+IL17+	0,29 ± 0,36	0,27	0,00 - 0,88
CD45RO+CD27+	13,42 ± 15,69	6,95	0,04 - 34,47
CD45RO+CD27+IL17+	0,57 ± 0,67	0,56	0,00 - 1,64
CD45RO+CD27-	3,97 ± 4,37	2,25	0,71 - 11,49
CD45RO+CD27-IL17+	0,39 ± 0,65	0,1	0,01 - 1,55
CD45RO-CD27-	37,60 ± 49,92	2,34	0,06 - 95,93
CD45RO-CD27-IL17+	0,51 ± 0,75	0,13	0,00 - 1,82
CD25+FOXP3+	21,57 ± 19,31	21,82	4,64 - 52,74
CD25+FOXP3+CD127-	16,03 ± 19,08	13,22	0,77 - 47,74
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,09 ± 0,11	0,05	0,00 - 0,27
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,37 ± 0,44	0,16	0,09 - 1,13
CD25+FOXP3+IL10+	0,38 ± 0,48	0,12	0,01 - 1,18
CD25+FOXP3+IL17+	0,84 ± 1,01	0,5	0,04 - 2,53
CD25+FOXP3+CD62L+	6,75 ± 7,75	5,85	0,08 - 18,96
CD25+FOXP3+Ki67+	5,17 ± 6,43	1,65	0,08 - 14,45
IFNyR+	6,52 ± 7,36	2,45	0,62 - 17,84

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente bei Stimulation in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu mit aCD3/aCD28 dargestellt.

Kinder T1DM EM	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	56,01 \pm 18,14	55,91	31,42 - 73,89
CD25+FOXP3+CD127-	48,10 \pm 15,45	48,65	27,16 - 68,51
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	1,00 \pm 1,83	0,12	0,03 - 4,25
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	2,44 \pm 1,86	2,47	0,42 - 5,17
CD25+FOXP3+IL10+	1,89 \pm 3,33	0,22	0,12 - 7,81
CD25+FOXP3+IL17+	3,25 \pm 4,03	1,33	0,81 - 10,33
CD25+FOXP3+CD62L+	7,77 \pm 11,69	2,49	1,20 - 28,50
CD25+FOXP3+Ki67+	35,35 \pm 19,58	43,80	12,76 - 55,34
IFNyR+	10,12 \pm 7,45	10,22	2,18 - 20,96
Kinder T1DM LZ	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	40,89 \pm 10,63	39,55	29,42 - 57,90
CD25+FOXP3+CD127-	30,19 \pm 14,04	32,02	7,26 - 44,52
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,14 \pm 0,19	0,02	0,00 - 0,44
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,61 \pm 0,49	0,49	0,14 - 1,17
CD25+FOXP3+IL10+	0,54 \pm 0,54	0,59	0,03 - 1,35
CD25+FOXP3+IL17+	1,24 \pm 0,83	0,82	0,64 - 2,62
CD25+FOXP3+CD62L+	11,31 \pm 3,92	10,15	7,10 - 17,57
CD25+FOXP3+Ki67+	14,44 \pm 8,64	12,28	3,09 - 23,74
IFNyR+	10,04 \pm 6,03	9,95	1,54 - 18,22
Kinder Kontrolle	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	50,23 \pm 17,74	46,10	27,48 - 74,82
CD25+FOXP3+CD127-	40,97 \pm 13,55	40,27	21,54 - 57,97
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,23 \pm 0,25	0,14	0,03 - 0,65
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	2,23 \pm 1,49	1,92	0,52 - 4,60
CD25+FOXP3+IL10+	0,68 \pm 0,81	0,50	0,04 - 2,08
CD25+FOXP3+IL17+	5,08 \pm 5,07	2,85	0,64 - 11,66
CD25+FOXP3+CD62L+	13,76 \pm 9,32	11,56	4,88 - 27,91
CD25+FOXP3+Ki67+	28,36 \pm 14,69	30,10	11,50 - 48,87
IFNyR+	13,87 \pm 12,88	8,22	6,15 - 36,57
Erwachsene T1DM	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	58,38 \pm 23,08	65,01	20,58 - 81,28
CD25+FOXP3+CD127-	50,64 \pm 20,23	55,80	18,41 - 73,00
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,35 \pm 0,43	0,21	0,09 - 1,11
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	1,93 \pm 1,21	1,69	0,36 - 3,57
CD25+FOXP3+IL10+	0,73 \pm 0,83	0,41	0,09 - 2,15
CD25+FOXP3+IL17+	2,94 \pm 2,17	1,91	1,40 - 6,58
CD25+FOXP3+CD62L+	4,55 \pm 2,47	4,23	1,26 - 7,54
CD25+FOXP3+Ki67+	20,96 \pm 26,70	11,61	2,45 - 66,77
IFNyR+	7,35 \pm 3,34	6,94	3,15 - 11,52
Erwachsene Kontrolle	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	37,03 \pm 20,12	32,11	21,17 - 71,96
CD25+FOXP3+CD127-	27,83 \pm 20,76	19,92	14,90 - 64,60
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,06 \pm 0,09	0,02	0,00 - 0,22
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,71 \pm 0,48	0,76	0,16 - 1,18
CD25+FOXP3+IL10+	0,31 \pm 0,29	0,21	0,03 - 0,65
CD25+FOXP3+IL17+	0,61 \pm 0,43	0,68	0,00 - 1,14
CD25+FOXP3+CD62L+	11,97 \pm 10,96	7,1	2,02 - 29,92
CD25+FOXP3+Ki67+	7,27 \pm 5,49	6,19	1,67 - 16,46
IFNyR+	6,61 \pm 4,90	6,75	0,87 - 12,81

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse der Zellkulturexperimente bei Stimulati-
on in einem antiinflammatorischen Zytokinmilieu mit *C. albicans*-Antigen darge-
stellt.

Kinder T1DM EM	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	8,86 \pm 2,45	8,26	6,62 - 13,00
CD25+FOXP3+CD127-	3,16 \pm 2,38	3,48	0,17 - 5,50
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,05 \pm 0,04	0,04	0,01 - 0,09
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,27 \pm 0,26	0,21	0,06 - 0,71
CD25+FOXP3+IL10+	0,81 \pm 0,42	0,84	0,41 - 1,44
CD25+FOXP3+IL17+	2,20 \pm 0,52	2,16	1,75 - 3,06
CD25+FOXP3+CD62L+	0,27 \pm 0,14	0,23	0,16 - 0,50
CD25+FOXP3+Ki67+	4,11 \pm 1,51	3,73	2,24 - 5,82
IFNyR+	3,07 \pm 3,28	1,62	0,66 - 8,60

Kinder T1DM LZ	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	4,46 \pm 1,99	4,19	1,73 - 6,46
CD25+FOXP3+CD127-	1,50 \pm 0,96	1,42	0,74 - 3,09
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,02 \pm 0,03	0,00	0,00 - 0,08
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,12 \pm 0,22	0,03	0,02 - 0,52
CD25+FOXP3+IL10+	0,31 \pm 0,15	0,39	0,09 - 0,44
CD25+FOXP3+IL17+	0,65 \pm 0,35	0,73	0,06 - 1,00
CD25+FOXP3+CD62L+	0,30 \pm 0,20	0,20	0,18 - 0,65
CD25+FOXP3+Ki67+	1,26 \pm 0,82	1,66	0,23 - 2,17
IFNyR+	2,66 \pm 1,79	2,10	1,52 - 5,84

Kinder Kontrolle	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	7,05 \pm 5,52	5,04	2,63 - 16,38
CD25+FOXP3+CD127-	3,14 \pm 2,87	2,24	0,53 - 7,40
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,03 \pm 0,03	0,01	0,00 - 0,07
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,26 \pm 0,37	0,10	0,01 - 0,90
CD25+FOXP3+IL10+	0,48 \pm 0,42	0,26	0,10 - 0,94
CD25+FOXP3+IL17+	2,01 \pm 2,01	1,81	0,27 - 5,30
CD25+FOXP3+CD62L+	0,44 \pm 0,22	0,45	0,18 - 0,69
CD25+FOXP3+Ki67+	2,46 \pm 1,96	1,95	0,72 - 5,49
IFNyR+	2,43 \pm 1,32	3,06	0,62 - 3,53

Erwachsene T1DM	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	9,23 \pm 2,85	7,81	6,97 - 13,45
CD25+FOXP3+CD127-	4,63 \pm 0,91	5,09	3,11 - 5,27
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,04 \pm 0,05	0,01	0,00 - 0,12
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,36 \pm 0,19	0,29	0,17 - 0,64
CD25+FOXP3+IL10+	0,41 \pm 0,46	0,22	0,02 - 1,20
CD25+FOXP3+IL17+	1,17 \pm 0,84	0,80	0,55 - 2,63
CD25+FOXP3+CD62L+	0,25 \pm 0,13	0,23	0,10 - 0,42
CD25+FOXP3+Ki67+	2,01 \pm 1,93	1,50	0,24 - 5,15
IFNyR+	3,59 \pm 3,44	2,48	1,10 - 9,53

Erwachsene Kontrolle	Mittelwert \pm SD	Median	Min-Max
CD25+FOXP3+	4,39 \pm 2,76	4,40	1,92 - 6,82
CD25+FOXP3+CD127-	1,13 \pm 0,66	0,90	0,62 - 2,10
CD25+FOXP3+CD127-IL10+	0,00 \pm 0,00	0,00	0,00 - 0,00
CD25+FOXP3+CD127-IL17+	0,02 \pm 0,03	0,01	0,00 - 0,07
CD25+FOXP3+IL10+	0,21 \pm 0,33	0,06	0,02 - 0,71
CD25+FOXP3+IL17+	0,45 \pm 0,21	0,47	0,19 - 0,68
CD25+FOXP3+CD62L+	0,97 \pm 1,31	0,42	0,11 - 2,91
CD25+FOXP3+Ki67+	0,94 \pm 0,43	0,99	0,39 - 1,40
IFNyR+	2,23 \pm 1,65	2,17	0,31 - 4,28

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Suppressionsassays dargestellt.

Patientencode	Proliferation			Index	
	1:1	1:0,5	1:0	1:0 / 1:1	1:0 / 1:0,5
E01	41,60 %	49,90 %	54,40 %	1,31	1,09
E02	34,10 %	44,80 %	55,80 %	1,64	1,25
E03	31,20 %	31,90 %	49,40 %	1,58	1,55
E04	37,30 %	39,00 %	80,70 %	2,16	2,07
P01	63,30 %	69,00 %	75,20 %	1,19	1,09
P02	60,70 %	67,40 %	78,30 %	1,29	1,16
P03	35,60 %	41,90 %	56,50 %	1,59	1,35
P04	49,20 %	61,00 %	81,60 %	1,66	1,34
P05	41,70 %	46,80 %	82,70 %	1,98	1,77
P06	12,00 %	10,10 %	18,70 %	1,56	1,85

Tab. 41: Suppressionsassays

	Anzahl n=	Mittelwert \pm SD	Median	Min - Max in %
Erwachsene Kontrolle	2	1,48 \pm 0,23	1,48	1,31 - 1,64
Erwachsene T1DM	2	1,87 \pm 0,41	1,87	1,85 - 2,16
Kinder Kontrolle	2	1,24 \pm 0,07	1,24	1,19 - 1,29
Kinder T1DM EM	2	1,63 \pm 0,05	1,63	1,59 - 1,66
Kinder Kontrolle	2	1,24 \pm 0,07	1,24	1,19 - 1,29
Kinder T1DM LZ	2	1,77 \pm 0,30	1,77	1,56 - 1,98

Tab. 42: Suppressionsassays, Vergleich der Index-Werte