

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer, FRCPE

**Oberflächenphänotypisierung und funktionelle Analyse von
T-Zellen des peripheren Blutes bei Kindern mit
Diabetes mellitus Typ 1**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stefan Friedrich Wellner

aus Heilbronn

Würzburg, Januar 2020

Referentin: Prof. Dr. med. M. Prelog
Korreferentin: Prof. Dr. med. S. Hahner
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2020

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	Organisationsstruktur des Immunsystems.....	1
1.1.2	Naive, Gedächtnis- und Effektorzellen.....	7
1.1.3	Muster der Zytokinproduktion verschiedener T-Zell-Populationen	10
1.1.4	T-Zell-Plastizität.....	16
1.1.5	Lymphozytenmigration.....	16
1.1.6	Autoimmunität.....	18
1.1.7	Immunoseneszenz.....	18
1.2	Diabetes mellitus im Kindesalter.....	19
1.2.1	Epidemiologie und Formen.....	19
1.2.2	Klinik des Diabetes mellitus Typ 1.....	21
1.2.3	Diagnostik des Diabetes mellitus Typ 1.....	22
1.2.4	Autoimmunpathogenese des Diabetes mellitus Typ 1.....	24
1.2.5	Therapie des Diabetes mellitus Typ 1.....	27
2	Zielsetzung dieser Arbeit.....	29
3	Materialien und Methoden.....	31
3.1	Patienten.....	31
3.1.1	Patientenkohorte.....	31
3.1.2	Ethikvotum, Patientenaufklärung und Blutentnahme.....	32
3.2	Medien, Substrate und Gerätschaften.....	32
3.3	Zellbiologische Methoden.....	38
3.3.1	Isolierung und Kryokonservierung der mononukleären Zellen des peripheren Vollblutes.....	38
3.3.2	Zellzahlbestimmung.....	38

3.3.3	Kryokonservierung und Auftauen Zellen	39
3.4	Immunologische Methoden.....	40
3.4.1	Allgemeine Erläuterungen und Begriffsklärungen	40
3.4.2	Präparation für die Bestimmung des Phänotyps ohne Beachtung der Zytokinproduktion (Phänotypisierung).....	40
3.4.3	Präparation für die Bestimmung der Zytokinproduktion diverser Lymphozytenpopulationen (Zytokinbestimmung)	42
3.5	Messung und Datenanalyse	43
3.5.1	Messung mittels Durchflusszytometrie	43
3.5.2	Auswertung der Messdaten.....	45
3.5.3	Statistische Analyse	46
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Allgemeine Daten der Patientengruppen	48
4.2	Verteilung von B-Zellen, Natürlichen Killerzellen und CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	49
4.3	Naive, Gedächtnis- und Effektor-Zellen	52
4.4	Expression von Chemokinrezeptoren	59
4.4.1	Expression von CXCR3 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	59
4.4.2	Expression von CCR5 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten.....	63
4.4.3	Expression von CCR6 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten.....	65
4.4.4	Betrachtung von CD161 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten sowie von CCR6 ⁺ CD161 ⁺ Zellen	67
4.4.5	Kombinierte Betrachtung der Expression von CCR6 und CCR5 auf CD4 ⁺ Lymphozyten	69
4.5	Zytokinproduktion der Lymphozytenpopulationen	70
4.5.1	Charakterisierung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α	73

4.5.2	Charakterisierung der IL-17-Produktion	76
4.5.3	Charakterisierung der Produktion von IL-4 und IL-10.....	77
4.6	Regulatorische T-Zellen.....	79
5	Diskussion	82
5.1	Verteilung von B-Zellen, CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen und natürlichen Killerzellen bei T1DM	82
5.2	Naive, Gedächtnis- und Effektorzellen bei T1DM	84
5.2.1	Veränderung der CD28-Expression bei T1DM.....	84
5.2.2	Naive T-Zellen bei T1DM	85
5.2.3	Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen bei T1DM.....	86
5.3	Veränderungen in CD4 ⁺ Effektorzellpopulationen bei T1DM	88
5.4	Veränderungen in CD8 ⁺ Effektorzellpopulationen bei T1DM.....	93
5.5	Veränderungen der TNF α -Produktion	96
5.6	Limitationen und mögliche Fehlerquellen	97
5.6.1	Limitationen durch die Probandenselektion.....	98
5.6.2	Limitationen durch das Probenmaterial	99
5.6.3	Limitationen der Durchflusszytometrie	99
5.7	Zusammenfassung	100
6	Zusammenfassung	103
7	Literaturverzeichnis	107
8	Abbildungsverzeichnis.....	119
9	Tabellenverzeichnis.....	120

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	APC-Cy7-Konjugatfarbstoff
APZ	antigenpräsentierende Zelle(n)
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>b cell receptor</i>)
BE	Proteinheit
BGS	Blutglukosespiegel
Cat.	Katalognummer (<i>catalog number</i>)
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Unterscheidungsgruppen (<i>cluster of differentiation</i>)
CMV	Zytomegalievirus (<i>Cytomegalovirus</i>)
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
d.h.	das heißt
DZ	Dendritische Zelle(n)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
HbA1c	Hämoglobin A1c
IFN γ	Gamma-Interferon
Ig	Immunglobulin
IK	Isotypkontrolle
IL	Interleukin
KE	Kohlenhydrateinheit
KG	Kontrollgruppe
KWT	Kruskal-Wallis-Test
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zellen
oGTT	oraler Glukose-Toleranz-Test
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein
PerCP-Cy5.5	PerCP-Cy5.5. Konjugatfarbstoff
PJ	Personenjahre
RORyt	RAR-related orphan receptor Subtyp γ t
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SSC	<i>sideward scatter</i>
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T1DM LS	langbestehender T1DM (T1DM <i>long standing</i>)
T1DM RO	kurzbestehender T1DM (T1DM <i>recent onset</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>t cell receptor</i>)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
Th-Zelle	T-Helfer-Zeller
Th1-Zelle	T-Helfer-Zellen Typ 1
Th2-Zelle	T-Helfer-Zelle Typ 2
Th17-Zelle	T-Helfer-Zelle Typ 17
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Organisationsstruktur des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einem angeborenen, oder auch „unspezifischen“ Arm und einem erworbenen, oder auch „spezifischen“ beziehungsweise „adaptiven“ Arm. Beide Teile wirken bei der Bekämpfung pathogener Organismen oder entarteter körpereigener Zellen Hand in Hand und haben gegenseitige regulatorische Einflüsse aufeinander, sodass eine vollständige klare Trennung nicht immer möglich ist.

Im Rahmen der Immunreaktion werden verschiedene Zytokine freigesetzt. Dies sind Proteine, die das Verhalten in der Nähe befindlicher Zellen beeinflussen.¹ Sie werden in folgende Untergruppen unterteilt:

- 1) Interleukine (IL)
- 2) Interferone (IFN)
- 3) Tumornekrosefaktoren (TNF)
- 4) Chemokine

Interleukin, Interferone und Tumornekrosefaktoren haben sehr vielfältige Wirkungen auf Immunzellen und auch auf andere Zellarten wie Fibroblasten oder Endothelzellen. Dabei werden Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse gesteuert, die Proteinexpression reguliert und vieles mehr.^{2,3} Chemokine hingegen wirken auf das Migrationsverhalten von Immunzellen und steuern somit, in welchen Geweben sich bestimmte Immunzellen sammeln.⁴

Genauer zu den verschiedenen Zytokinen wird in den entsprechenden Kapiteln besprochen. Im Folgenden wird weiterhin oft über Oberflächenproteine von Zellen gesprochen. Diese werden meist als *cluster of differentiation* (CD) bezeichnet, gefolgt von einer Nummer (z.B. CD3), entsprechend der international in den *Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshops* festgelegten Nomenklatur.⁵

Zur Kennzeichnung, ob über Zellen gesprochen wird, die ein bestimmtes Oberflächenmerkmal/Zytokin oder einen bestimmten Transkriptionsfaktor

1 Einleitung

exprimieren oder nicht, werden in dieser Arbeit jeweils ein hochgestelltes + oder – verwendet (z.B. CD3⁺ bzw. CD3⁻).

1.1.1.1 Angeborene, unspezifische Immunreaktion

Die unspezifische Immunreaktion ist dadurch gekennzeichnet, dass sie bereits vor Kontakt zu Krankheitserregern vollständig funktionsfähig ist und im Falle eines Kontaktes mit einem Pathogen sofort aktiviert werden kann. Dies beruht darauf, dass Zellen, die eine unspezifische Immunreaktion vermitteln, auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für Strukturen exprimieren, welche typischerweise auf Krankheitserregern wie Bakterien oder Pilzen vorzufinden sind. Die Bindung dieser Rezeptoren an ihre jeweilige Zielstruktur setzt dann Mechanismen in Gang, die zur Abtötung des gebundenen Krankheitserregers führen.^{6,7} Über diesen Mechanismus können geringe Mengen an Krankheitserregern, die in den Körper eingedrungen sind, vor Ort eliminiert werden, ohne ihnen eine Chance zur weiteren Ausbreitung zu bieten.

Die angeborene Immunreaktion wird in erster Linie durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten (Neutrophile) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelt. Eosinophilen und basophilen Granulozyten sind vor allem Funktionen im Rahmen spezieller Umstände (z.B. Abwehr mehrzelliger Parasiten) vorbehalten, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Eine weitere Zellgruppe der angeborenen Immunantwort stellen Mastzellen dar, welche durch das Ausschütten ihrer intrazellulären Granulae ebenfalls Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Allerdings ist auch ihre Funktion nach wie vor nicht vollständig verstanden und auch auf sie wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.^{1,6,7}

1.1.1.2 Antigenpräsentierende Zellen (APZ)

Wenngleich eine Vielzahl von Signalen zwischen Zellen der angeborenen Immunantwort und Zellen der spezifischen Immunantwort existieren, so gibt es doch einzelne Zellgruppen des angeborenen Immunsystems, welche von besonders herausragender Bedeutung für die Verknüpfung sind. Hierzu gehören in erster Linie Dendritische Zellen (DZ) und auch Makrophagen. Sie können Pathogene phagozytieren und anschließend den Zellen der

1 Einleitung

spezifischen Immunantwort zu präsentieren, weswegen sie Antigenpräsentierende Zellen (APZ) genannt werden. Die Fähigkeit Antigen zu präsentieren ist jedoch nicht einzigartig für APZ, sondern kann prinzipiell durch fast jeder Körperzelle erfolgen. Die Besonderheit der APZ liegt darin, dass sie infolge komplexer Signale die Zellen, welchen sie die Antigene präsentieren, aktivieren können und somit dazu befähigen, ihre immunologische Funktion auszuführen. Während Makrophagen ein hohes Phagozytose-Potenzial haben und somit Pathogen-Zahlen effizient reduzieren können, spielt die Phagozytose durch DZ quantitativ keine bedeutsame Rolle. Dafür haben DZ jedoch ein größeres Potenzial zur Aktivierung der spezifischen Immunantwort und sind für eine suffiziente spezifische Immunreaktion unerlässlich.^{1,7,8}

1.1.1.3 Erworbene, spezifische Immunreaktion

Während die angeborene Immunreaktion durch ihre schnelle Aktivierbarkeit gut geeignet ist, kleinere Erregermengen zu bekämpfen, ist zur Beseitigung größerer Erregermengen die spezifische Immunreaktion nötig, welche sich durch eine stärkere, besser an den Erreger angepasste Reaktion auszeichnet, die jedoch längere Aktivierungslatenz hat. Das Prinzip der erworbenen Immunreaktion beruht auf Rezeptoren, welche nur an ein für einen speziellen Krankheitserreger spezifisches Antigen binden und anschließend eine Reaktion spezifisch gegen diesen Erreger hervorrufen.^{1,7} Solche Rezeptoren sind auf T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) zu finden und werden als T- bzw. B-Zell-Rezeptoren bezeichnet.

Um ein Repertoire an T- bzw. B-Zell-Rezeptoren zu gewährleisten, welches die gesamte Bandbreite möglicher Fremdartigene abdeckt, erfolgen während der Ausreifung von T- bzw. B-Zellen quasi zufällige Rekombinationen der Gene, welche für Rezeptorbestandteile kodieren. Dadurch besitzt nach abgeschlossener Ausreifung jede Zelle einen Rezeptor mit einzigartiger Struktur, welcher ein spezifisches Antigen erkennt. Parallel hierzu wird sichergestellt, dass Zellen, welche einen funktionsunfähigen Rezeptor besitzen, abgetötet werden (= positive Selektion) und auch Zellen, deren

1 Einleitung

Rezeptor körpereigene Strukturen erkennt, absterben (= negative Selektion).^{1,9,10}

Reifungsprozess und Funktionsweise von B-Zellen

B-Zellen reifen im Knochenmark aus pro-B-Zellen heran und werden als reife B-Zellen in die Blutbahn entlassen, welche jedoch noch keine Antikörper sezernieren. Ein Charakteristikum der im Blut zirkulierenden B-Zellen ist die Expression der Oberflächenproteine *cluster of differentiation 19* (CD19) und CD20, welche somit als Markerproteine für diese Zellpopulation dienen können.^{1,11} Bindet der BCR sein Antigen, so kommt es zur Internalisierung des BCR-Protein-Komplexes und nach weiterer Prozessierung zur Präsentation der Proteinfragmente auf der B-Zell-Oberfläche mittels des *major histocompatibility complex* (MHC) *class II* (MHC-II). Die auf diese Weise präsentierten Antigene können von T-Zellen erkannt werden, was zu einer Interaktion zwischen B- und T-Zelle sowie konsekutiver Proliferation der B-Zelle und Ausdifferenzierung zur antikörperproduzierenden Plasmazelle führt.¹² Erkennt eine B-Zelle ein Polysaccharid als Antigen, so kann es sogar ohne weiteren Stimulus durch eine T-Zelle zur Antikörperproduktion kommen.¹¹ Sezernierte Antikörper binden spezifisch an das zuvor erkannte Antigen und können dadurch dessen Funktionsfähigkeit senken, dessen Phagozytose erleichtern oder eine Bindung von Komplementfaktoren an das Antigen bewirken. Dadurch wird die Effizienz der unspezifischen Immunreaktion gegen dieses Antigen entscheidend erhöht. B-Zellen besitzen auch andere regulatorische und Effektoreigenschaften, welche ebenfalls wichtig für eine optimale Immunreaktion sind, jedoch weitaus weniger untersucht und verstanden, als die Antikörper-Produktion, und auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.¹¹

Reifung, Aktivierung und Funktionsweise von T-Zellen

Auch T-Zell-Vorläufer stammen ursprünglich aus dem Knochenmark, wandern jedoch schon früh über die Blutbahn in den Thymus ein und differenzieren sich erst dort zu reifen T-Zellen aus. Diese sind unter anderem gekennzeichnet durch die Expression eines funktionsfähigen TCR, des Korezeptors CD3 und eines der beiden Korezeptoren CD4 oder CD8.^{1,9,13} CD3 stellt somit einen

1 Einleitung

Marker für T-Zellen dar. Seine Funktion besteht darin, durch Komplexbildung mit dem TCR das durch Antigen-Bindung erzeugte Signal nach intrazellulär weiterzuleiten.¹⁴

Um effizient aktiviert zu werden sind T-Zellen darauf angewiesen, dass ihnen ihr entsprechendes Antigen auf der Zelloberfläche anderer körpereigener Zellen mittels MHC-I oder MHC-II präsentiert wird. Hierfür sind die Korezeptoren CD4 und CD8 von Bedeutung. Wird ein Antigen auf MHC-I präsentiert, so kann das Signal durch den Korezeptor CD8 verstärkt werden, welcher an MHC-I bindet. Bei Antigenpräsentation mittels MHC-II wird der Korezeptor CD4 zur Signalverstärkung benötigt.^{1,7,8,15}

MHC-I wird auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentiert Antigene, welche aus dem eigenen Zellinneren stammen.¹⁶ Sind diese Antigene wirklich „körpereigen“, so sollten sie nicht von T-Zellen erkannt werden. Sind sie jedoch körperfremd, so werden sie erkannt. Dies trifft beispielsweise auf virusinfizierte oder entartete Zellen zu, deren Proteinexpression nicht der gesunder Zellen entspricht. Dendritische Zellen können außerdem phagozytierte (exogene) Proteine auf MHC-I präsentieren und konsekutiv die Effektorantwort gegen diese Proteine verstärken.^{8,16}

Im Gegensatz zu MHC-I wird MHC-II nur auf APZ exprimiert und trägt vorwiegend exogene Antigene, die zuvor durch Phagozytose aufgenommen wurden.^{8,15}

CD8⁺ T-Zellen können infolge einer TCR-Stimulation durch einen Antigen/MHC-I-Komplex zytotoxische Stoffe aus intrazellulären Granula gezielt in Richtung der Zelle ausschütten, auf deren Oberfläche das Antigen präsentiert wurde und diese somit abtöten. Diese Fähigkeit von CD8⁺ T-Zellen liegt jedoch nicht von Beginn an vor, da der Stimulus, den eine Antigen-Präsentation durch eine normale Körperzelle erhält, nicht stark genug ist. Es wird zuvor ein „Priming“ durch Kontakt zu einer APZ mit entsprechendem präsentierten Antigen benötigt, oft noch unterstützt durch Signale von CD4⁺ T-Zellen.^{1,15} Zu den aus den Granula freigesetzten Stoffen zählen Perforin, Granzyme und proapoptotische Serinproteasen.¹⁷ Perforin formt in der Zellmembran der Zielzelle Poren, durch welche die anderen sezernierten Substanzen in das

1 Einleitung

Zellinnere eindringen und Mechanismen in Gang setzen können, welche zur Apoptose der Zielzelle führen.¹⁷ Ein weiterer möglicher Effektormechanismus von CD8⁺ T-Zellen ist die Erhöhung der Expression von CD95L (= FasL), was durch Bindung an das auf der Oberfläche von Zielzellen exprimierte CD95 (Fas) proapoptotische Signale an diese sendet.¹⁶ Aufgrund der starken zytotoxischen Funktion von CD8⁺ T-Zellen werden sie auch oft als „zytotoxische T-Zellen“ bezeichnet. Dies ist jedoch ungenau, da sowohl Natürliche Killerzellen (NK-Zelle), als auch manche CD4⁺ T-Zellen auf gleiche Weise zytotoxisch wirken können.¹⁶ Außerdem können CD8⁺ T-Zellen auch Zytokine ausschütten und somit auf nicht-zytotoxischem Weg auf die Immunreaktion einwirken (siehe Kapitel 1.1.3.5).

Im Gegensatz zu aktivierten CD8⁺ T-Zellen nehmen aktivierte CD4⁺ T-Zellen mittels Zytokinsekretion vorwiegend modulierenden Einfluss auf die Immunreaktion und wirken nur selten direkt zytotoxisch. Sie werden deshalb auch als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet. Für die initiale Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen ist dabei wie auch bei CD8⁺ T-Zellen der Kontakt zu einer APZ nötig.¹⁵ Die durch CD4⁺ T-Zellen bewirkten Effekte sind extrem vielfältig und betreffen Makrophagen, dendritische Zellen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und noch viele weitere Zellarten. Um diese verschiedenartigen Funktionen von T-Helferzellen besser zu verstehen, ist eine Einteilung dieser nach dem Muster der von ihnen sezernierten Zytokine sinnvoll. Darauf wird in Kapitel 1.1.3 genauer eingegangen.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und NK-T-Zellen

Die dritte Untergruppe der Lymphozyten stellen NK-Zellen dar. Ihr Name rührt her von der ersten für sie bekannten Funktion, nämlich das Abtöten körpereigener Zellen, welche bestimmte für körpereigene Zellen typische Oberflächenmoleküle (z.B. MHC I) nicht mehr exprimieren („missing self“). Dies kommt vor allem auf virusinfizierten Zellen und Tumorzellen vor, womit diese Zellen besonders effizient durch NK-Zellen bekämpft werden. Es sind jedoch auch regulatorische Funktionen von NK-Zellen beschrieben, welche unter

1 Einleitung

anderem auf protektive Wirkungen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen hindeuten.¹⁸

Zu den Oberflächenmarkern von NK-Zellen zählt unter anderem das Adhäsions-Molekül CD56.¹⁹

Unter dem Namen NK-T-Zellen versteht man Zellen, welche durch die Ko-Expression von TCR und NK-Zell-typischen Oberflächenmarkern gekennzeichnet sind. Sie haben ein hohes Potenzial zur Zytokin-Produktion und ihnen werden immunregulatorische Funktionen zugesprochen. Die genauen Oberflächenmerkmale dieser Zellpopulation sind in der Literatur nach wie vor nicht genau definiert. In dieser Arbeit werden sie als CD3⁺CD56⁺ definiert, wenngleich dies nicht alle NKT-Zellen umfasst.^{20,21}

1.1.2 Naive, Gedächtnis- und Effektorzellen

Innerhalb der Gruppe der T-Lymphozyten wurden in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Untergruppen charakterisiert, denen jeweils verschiedene Funktionen im Rahmen der adaptiven Immunantwort zugesprochen werden. Eines der bedeutsamsten Einteilungssysteme ist dabei die Unterscheidung von naiven T-Zellen, Gedächtniszellen und Effektorzellen.²² Dabei stellen naive T-Zellen die chronologisch erste Differenzierungsform dar. Es handelt sich hierbei um T-Zellen, welche im Thymus vollständig ausgereift und in die Blutbahn übergegangen sind, jedoch bisher noch keinen Kontakt zu ihrem jeweiligen Zielantigen hatten. Sie weisen – mit Ausnahme von IL-2 – nur geringe Potenz zur Produktion von Zytokinen auf bzw. haben noch keine zytotoxische Aktivität.^{16,22,23}

Der weitere Differenzierungsweg der naiven T-Zelle zu Gedächtnis-beziehungsweise Effektorzelle ist trotz intensiver Forschung nach wie vor nicht vollständig geklärt. Man geht derzeit von einem vorwiegend linearen Differenzierungsweg von der naiven über die Gedächtnis- zur Effektorzelle aus. Dabei werden zwei Formen der Gedächtniszellen unterschieden: Die zentrale Gedächtniszelle und die Effektor-Gedächtniszelle. Nach Antigenstimulus differenzieren sich naive T-Zellen zu zentralen Gedächtniszellen und diese dann weiter zu Effektor-Gedächtniszellen.²⁴⁻²⁶ Diese fortgeschrittenen Differenzierungsformen weisen ein hohes Potenzial zur Produktion von

1 Einleitung

Zytokinen und/oder zytotoxischen Substanzen auf.^{22,23,25,27} Außerdem ist ihre Aktivierung durch Antigen-Stimulus leichter und hat eine schnellere Effektorantwort zur Folge.^{16,23} Die vermutlich finale Differenzierungsstufe stellt die CD45RA⁺ Effektor-Gedächtniszelle dar.

Im nachfolgenden Text werden in Anlehnung an die allgemein üblichen englischsprachigen Bezeichnungen naive T-Zellen mit T_N (*naive*), zentrale Gedächtniszellen mit T_{CM} (*central memory*), Effektor-Gedächtniszellen mit T_{EM} (*effector memory*) und terminal ausdifferenzierte Effektor-Gedächtniszellen mit T_{EMRA} (*effector memory cells expressing CD45RA*) abgekürzt.

1.1.2.1 Markerproteine für naive, Gedächtnis- und Effektorzellen

Zur experimentellen Untersuchung der verschiedenen naiven, Gedächtnis- und Effektorpopulationen wurden in den vergangenen Jahren mehrere Oberflächenantigene beschrieben, welche je nach Expressionsmuster für bestimmte Populationen typisch sind. Die dafür am häufigsten verwendeten Oberflächenantigene sind CD45RA (bzw. dessen Isoform CD45RO), CD28, CD27 und CD62L und CCR7.^{25,28} Allerdings gibt es keine einheitliche Definition für T_N, T_{CM}, T_{EM} oder T_{EMRA}, sondern sie werden in unterschiedlichen Studien häufig anhand unterschiedlicher Antigene bestimmt.

Die meisten Studien beziehen die Bestimmung der Expression von CD45RA oder CD45RO für die Zellcharakterisierung mit ein. Es handelt sich hierbei um zwei Isoformen des gleichen Proteins, von denen im Laufe der Differenzierung der T-Zellen typischerweise jeweils überwiegend eine exprimiert, wobei auch doppelt positive Zellen vorkommen.^{29,30} Ein CD45RA⁺ bzw. CD45RO⁻ Phänotyp liegt auf T_N und T_{EMRA} vor, während ein CD45RA⁻ bzw. CD45RO⁺ Phänotyp bei T_{CM} und T_{EM} zu finden ist.

Durch die Einbeziehung eines zweiten Antigens kann dann zwischen T_N und T_{EMRA}, beziehungsweise T_{CM} und T_{EM} unterschieden werden. Die Kombinationen CD45RA⁺CCR7⁺, CD45RA⁺CD27⁺, CD45RA⁺CD62L⁺ und CD45RA⁺CD28⁺ werden auf T_N gefunden, während T_{EMRA} CD45RA⁺CCR7⁻, CD45RA⁺CD27⁻, CD45RA⁺CD62L⁻ oder CD45RA⁺CD28⁻ sind. Die Unterscheidung von T_{CM} und T_{EM} erfolgt auf die gleiche Weise, wobei die

1 Einleitung

Expression von CCR7, CD27, CD62L oder CD28 v.a. für T_{CM}-Zelle typisch sind. Im Laufe der Differenzierung zu T_{EM}-Zellen werden diese Marker zunehmend vermindert exprimiert.^{22,23,25,26,31}

Problematisch wird die strikte Einteilung der Population nach diesem Modell vor allem aus dem Grund, dass der Verlust der Expression der einzelnen Marker im Laufe der Differenzierung nicht gleichzeitig erfolgt, sondern sequenziell. So wurden beispielsweise CD45RA⁻CD27⁺CD28⁻ und CD45RA⁻CD27⁻CD28⁺ Zellen als Zwischenstufen zwischen CD45RA⁻CD27⁺CD28⁺ und CD45RA⁻CD27⁻CD28⁻ Zellen beschrieben.²⁶ Dies verdeutlicht, dass die Charakterisierungen der verschiedenen T-Zell-Populationen anhand unterschiedlicher Marker-Kombinationen (z.B. Verwendung von CD27 statt CD28) nicht vollständig decken und bei der Kombination mehrerer Marker weitere Untergruppen dargestellt werden können.

Eine aktuelle Vorstellung der Expression der verschiedenen Oberflächenantigene im Laufe der Differenzierung einer T-Zelle von T_N zu T_{EMRA} kann Abbildung 1.1 entnommen werden (nach den Daten der MASIR 2008 Konferenz sowie der Poster-Daten von Bagwell et al. zur CYTO 2014).^{25,32} Es muss allerdings bedacht werden, dass dies nur zwei von vielen derzeit diskutierten Modellen sind, wobei die Grundzüge sich jeweils sehr ähneln. Insbesondere ist auch zu beachten, dass sich CD4⁺ und CD8⁺ Zellen hinsichtlich des Verlaufes der Expressionsmuster im Rahmen der Differenzierung zwar ähneln, es jedoch auch Unterschiede zwischen den beiden Populationen gibt.

1 Einleitung

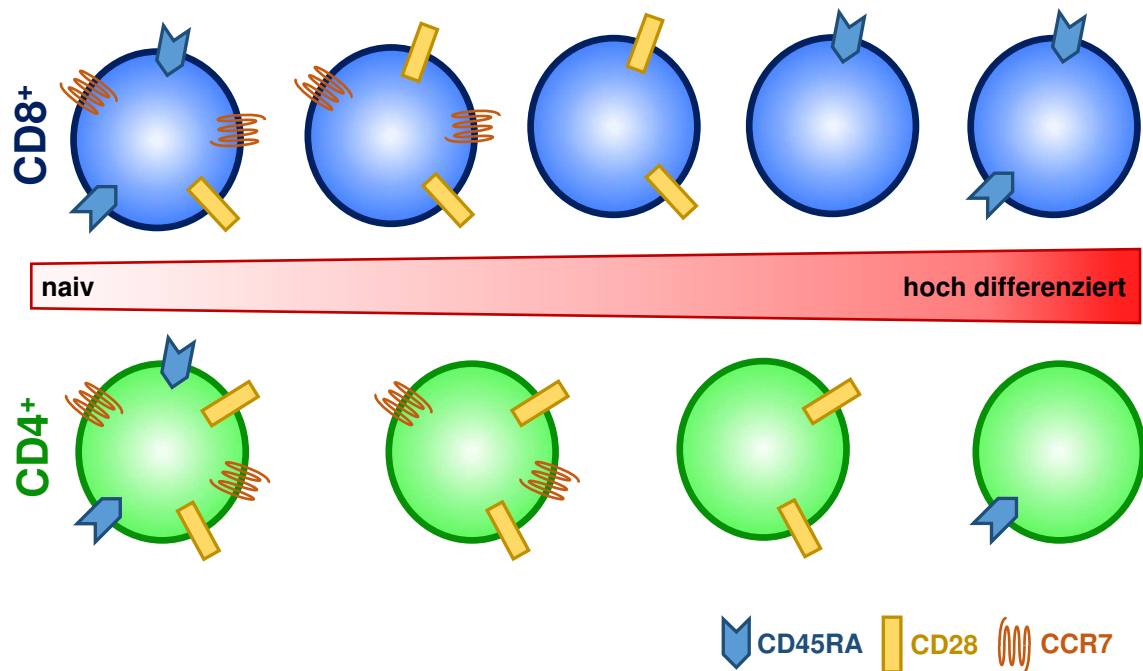


Abbildung 1.1 Differenzierungsstadien von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen
CD8⁺CD45RA⁻ CCR7⁺CD28⁺ sowie CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻CD28⁻ Zellen sind Stadien, welche zahlenmäßig nur gering vertreten sind. Die Daten von Bagwell et al. Referenz angeben deuten an, dass bei CD8⁺ Zellen CD28 als Differenzierungsmarker der Stadien eine wichtige Rolle spielt, da CD45RA und CCR7 nur kurz versetzt zueinander herunterreguliert werden. Bei CD4⁺ Zellen hingegen werden CD45RA und CCR7 nacheinander herunterreguliert, weswegen hier CD28 von geringerer Bedeutung ist.

1.1.3 Muster der Zytokinproduktion verschiedener T-Zell-Populationen

Alternativ beziehungsweise ergänzend zur oben beschriebenen Einteilung der T-Zellen in naive T-Zellen, Gedächtniszellen und Effektorzellen kann man auch zwischen T-Zell-Populationen mit unterschiedlichen Mustern der Zytokinproduktion unterscheiden. Diese Einteilung ist vor allem für CD4⁺ T-Helferzellen verbreitet. Schon früh beschrieben wurden Th-Zellen vom Typ 1 und Typ 2 (Th1- bzw. Th2-Zellen).³³ Th1-Zellen wird vor allem Bedeutung für die Regulation zellulärer Immunantwort zugesagt, während Th2-Zellen vor allem für humorale und allergische Immunprozesse von Bedeutung sind.³⁴ Später entdeckte man außerdem regulatorische Th-Zellen (T_{reg}), deren genauer Phänotyp und exakte Funktionsweise und Bedeutung *in vivo* auch

1 Einleitung

aktuell noch intensiv untersucht werden.^{35,36} Zu den erst jüngst entdeckten Th-Zell-Typen zählt schließlich die Th-Zelle Typ 17 (Th17-Zelle).

Im Folgenden sollen diese Typen von (CD4⁺) Th-Zellen genauer beschrieben werden und auch auf die Zytokinproduktion von CD8⁺ T-Zellen eingegangen werden. Neben den genannten Typen von Th-Zellen existieren auch noch weitere Typen, auf die jedoch hier nicht genauer eingegangen werden soll, unter anderem auch, da deren Bedeutung und Funktion oftmals kaum verstanden sind.

1.1.3.1 Th1-Zellen

Wie bereits vor 1990 beschrieben, produzieren Th1-Zellen im Gegensatz zu Th2- und Th17-Zellen große Mengen Interferon- γ (IFN γ)^{33,37}, weswegen dieses Zytokin auch als Signaturzytokin der Th1-Zellen bezeichnet wird.

Die biologischen Effekte von IFN γ sind sehr vielfältig.³⁸ In B-Zellen fördert IFN γ den Immunglobulin(Ig)-Klassenwechsels zu IgG2a und inhibiert den Ig-Klassenwechsel zu IgG1 und IgE, es fördert die Ausbildung von MHC-I und MHC-II und unterstützt somit die T-Zell-Aktivierung, es fördert die Immunzellmigration in entzündetes Gewebe und es hat regulatorische Effekte auf die Wiederherstellung der T-Zell-Homöostase nach antigeninduzierter T-Zell-Expansion. Außerdem wirkt IFN γ ebenso wie IL-12, welches ebenfalls von Th1-Zellen ausgeschüttet wird²⁷, als Stimulus für die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen.³⁷

Neben IFN γ und IL-12 sezernieren Th1-Zellen auch IL-2, TNF α und Lymphotoxin.^{27,37} Auf ihrer Zelloberfläche werden typischerweise die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 exprimiert (siehe auch Kapitel 1.1.5).^{4,25,27,39}

TNF α hat ebenso wie IFN γ eine Vielzahl von Wirkungen auf den Organismus³: Es bewirkt über verschiedene Mechanismen die Rekrutierung Neutrophiler in entzündliches Gewebe und verstärkt die Effizienz sowohl von Neutrophilen, als auch von Makrophagen, bei der Beseitigung von pathogenen Erregern. Außerdem wirkt es stimulierend auf T-Zellen und moduliert auch die B-Zell-Antwort.

1 Einleitung

1.1.3.2 Th2-Zellen

Th2-Zellen sezernieren als Signaturzytokine die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13.^{27,37}

Zu den Funktionen von IL-4 gehören unter anderem die Förderung der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zusammen mit vermehrter Expression von MHC-II und CD23 (niedrig-affiner IgE-Rezeptor), Antikörper-Klassenwechsel zu IgE, sowie Suppression proinflammatorischer Zytokine. Ihm wird außerdem eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr gegen Parasiten, sowie bei der Entstehung von Allergien zugesprochen.^{40,41} Die biologischen Wirkungen von IL-13 überlappen sich dabei in weiten Teilen mit denen von IL-4.⁴⁰

Das dritte Signaturzytokin, IL-5, fördert ebenfalls die Ausdifferenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Zellen, verstärkt jedoch auch maßgeblich die Differenzierung, Rekrutierung und Aktivität von Eosinophilen.⁴²

Neben diesen Signaturzytokinen sezernieren Th2-Zellen auch TNF α , IL-2 und IL-9, jedoch weder IFN γ noch Lymphotoxin.³⁷ Zu den für Th2-Zellen typischen Oberflächenproteinen gehören die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4, CCR8 und CXCR4.^{4,25,27}

Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen wird durch IL-2 und IL-4 gefördert, wodurch wiederum ein positiver Rückkopplungskreislauf entsteht, analog zur Rolle von IFN γ und IL-12 bei Th1-Zellen.^{37,41}

1.1.3.3 Th17-Zellen

Th17-Zellen wurde erst lange Zeit nach der Entdeckung von Th1- und Th2-Zellen beschrieben.^{34,43} Ihr Signaturzytokin IL-17 spielt eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Bakterien und Pilzen⁴⁴, wobei hierfür vor allem chemotaktische Effekte des Zytokins von Bedeutung sind. Es fördert die Ausschüttung verschiedener Chemokine durch Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen, was zu einer erhöhten Einwanderung von Makrophagen und Neutrophilen in das Gewebe führt. Zudem bewirkt es eine Verstärkung der T-Zell-Antwort durch Induktion von ICAM, einem Adhäsionsmolekül, welche für die Extravasation von Lymphozyten von Bedeutung ist.^{43,45}

1 Einleitung

Die Differenzierung von T-Zellen zu Th17-Zellen wird wiederum vom Zytokinmilieu bestimmt: IL-6 und TGF- β bewirken maßgeblich die Differenzierung naiver CD4-Zellen zu Th17-Zellen.^{46,47} IL-21, welches ebenfalls von Th17-Zellen sezerniert wird, kann dabei IL-6 teilweise ersetzen, wenngleich es die Th17-Differenzierung weniger effizient fördert.^{48,49} Im Laufe der Ausdifferenzierung zu Th17-Zellen wird zudem zunehmend der Rezeptor für IL-23 (IL-23R) exprimiert, wodurch die Zelle IL-23-responsiv wird. IL-23 unterstützt dann die Aufrechterhaltung der Th17-Differenzierung, obwohl es in der initialen Differenzierungsphase vermutlich keine, oder nur eine geringe Rolle spielt.^{47,50}

Zur Detektion von Th17-Zellen kann man sich die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 auf ihrer Zelloberfläche zunutze machen. Dieser Marker wird auf Th17-Zellen exprimiert, jedoch weder auf Th1- noch auf Th2-Zellen.^{51,52} Allerdings wird CCR6 nicht ausschließlich auf Th17-Zellen exprimiert, sondern auch auf anderen Zellen wie beispielsweise T_{reg} (siehe Kapitel 1.1.3.4).⁵³ Es wurden auch andere Chemokinrezeptoren auf Th17-Zellen beschrieben (CCR2, CCR4, CCR5, CXCR3)^{4,51}, die jedoch weit weniger spezifisch sind als CCR6. Neben CCR6 exprimieren Th17-Zellen außerdem CD161.⁵⁴ Ein weiteres spezifisches Merkmal ist die Expression der γ t-Isoform des Transkriptionsfaktors *retinoid acid receptor-related orphan receptor* (ROR γ t), dessen Expression von zentraler Bedeutung für die Differenzierung zur Th17-Zelle ist.⁵¹

1.1.3.4 Regulatorische T-Zellen

Bei der Ausbildung einer T-Zell-Antwort auf einen Antigen-Stimulus spielen neben stimulierenden Signalen auch inhibierende Signale eine Rolle, die oft auch als „regulierend“ bezeichnet werden. So unterdrückt eine sich ausbildende Th2-Antwort eine gleichzeitige Th1-Antwort durch die Produktion von IL-4, welches die Differenzierung zur Th1-Zelle antagonisiert.⁵⁵ Im Gegensatz dazu hat IFN γ suppressive Wirkung auf die Ausbildung einer effizienten Th2-Antwort.^{38,56} TGF- β wiederum hat neben der Stimulation der Differenzierung zur

1 Einleitung

Th17-Zelle inhibitorische Effekte auf die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen.⁵⁷

Neben diesen regulatorischen Mechanismen, welche dazu beitragen, dass sich während einer Immunantwort jeweils eine bestimmte Th-Zell-Linie ausbildet und andere Th-Zell-Linien in ihrer Ausbildung unterdrückt werden, gibt es auch Signale, welche allgemein suppressiv betonte Wirkung auf mehrere Zelllinien haben. Derartige Zell-Zell-Kontakt-vermittelte oder auch Zytokin-vermittelte Signale werden durch sogenannte regulatorische T-Zellen (T_{reg}) ausgesendet, welche ebenfalls CD4 exprimieren und somit zu den Th-Zellen gezählt werden. Die Funktion dieser Zellen für die Regulation der Immunantwort ist nicht eindeutig geklärt. Im Rahmen der hier vorliegenden Studie muss besonders auf die Hypothese hingewiesen werden, dass T_{reg} wichtig sind für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen.⁵⁸ Es sei hier angemerkt, dass aufgrund der Beobachtungen, dass regulatorische Signale auch von Th1-, Th2-, Th17- und anderen Th-Zell-Linien ausgehen können, die Klassifikation von T_{reg} als separate Zelllinie in Fachkreisen teils kritisch hinterfragt wird.⁵⁸

Zu den von T_{reg} sezernierten Zytokinen zählen IL-10, TGF- β und IL-35⁵⁹, wobei IL-10 und TGF- β am besten untersucht sind.⁶⁰ TGF- β ist dabei nicht nur eines der Effektor-Zytokine von T_{reg} , sondern stellt gleichzeitig zusammen mit IL-2, welches nicht von T_{reg} produziert wird, eine wichtige Komponente für die Differenzierung von T_{reg} dar.³⁷ IL-10 ist ein potentes immunsuppressives Zytokin, welches unter anderem von T_{reg} produziert wird, und dessen Defizienz in T_{reg} auch mit Autoimmunität in Zusammenhang gebracht wurde.⁶⁰

Aktuell noch nicht geklärt ist dabei die Frage, inwiefern diese Zytokine für die Funktion von T_{reg} von Bedeutung sind. Es ist anzunehmen, dass diese Frage nicht allgemeingültig beantwortet werden kann, sondern die suppressive Funktion von T_{reg} vielmehr je nach Situation von Zytokinsekretion, Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Mechanismen, zytolytischer Aktivität oder Entzug von Zytokinen aus dem jeweiligen Milieu abhängt.⁵⁹

Es ist außerdem interessant, dass auch die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-17 durch T_{reg} beschrieben wurde^{61,62}. Dies

1 Einleitung

stellt wiederum in infrage, ob es sich bei T_{reg} nicht auch um Zellen anderer Th-Zell-Linien handeln könnte, welche gleichzeitig regulatorisches Potenzial haben.

Phänotypische Charakteristika von T_{reg} sind unter anderem die Expression von CD25 und die intrazelluläre Nachweisbarkeit des Transkriptionsfaktors *forkhead box protein P3* (FoxP3).⁶³ Außerdem wurde auch verminderte oder fehlende Expression von CD127 als guter Marker von T_{reg} beschrieben.⁶⁴ CD25 ist die α -Kette eines hoch-affinen IL-2-Rezeptorkomplexes, welcher auf T_{reg} und auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Durch die hohe Affinität dieses Rezeptorkomplexes für das antiapoptotische Zytokin IL-2 haben regulatorische T-Zellen einen Überlebensvorteil in Gegenwart nicht-aktivierter Zellen, welche einen geringer-affinen IL-2-Rezeptor (CD25) exprimieren. Gegenüber aktivierten nicht-regulatorischen Zellen verlieren T_{reg} diesen relativen Vorteil, was wichtig für die Expansion von Effektor-T-Zellen nach Antigen-Kontakt sein könnte.⁶³

1.1.3.5 Zytokinproduktion in CD8⁺ T-Zellen

Da CD8⁺ T-Zellen in der Regel als „zytotoxische Lymphozyten“ bezeichnet werden, wird impliziert, dass sie ihre Funktion durch zytotoxische Zell-Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen erfüllen. Obwohl dies natürlich richtig ist, muss doch auch bedacht werden, dass CD8⁺ T-Zellen auch Zytokine sezernieren. Hierbei sind vor allem IFN γ , TNF α und Lymphotoxin von Bedeutung.⁶⁵⁻⁶⁷

Obwohl es in Anlehnung an die Einteilung der T-Helferzellen in Th1- und Th2-Zellen auch ein Modell zur Einteilung in zytotoxische Lymphozyten vom Typ 1 bzw. Typ 2 gibt (Tc1- und Tc2-Zellen)⁶⁶, ist dessen Anwendung weniger üblich als bei T-Helferzellen, unter anderem, da die sehr große Mehrheit der Zellen zur Tc1-Linie gehört.

Wenngleich eine Bedeutung der Zytokinproduktion durch CD8-Zellen für deren Funktion naheliegend erscheint, ist doch die Studienlage zur Auswirkung gestörter Zytokinproduktion durch diese Zellen nach wie vor unschlüssig.¹⁶

1 Einleitung

1.1.4 T-Zell-Plastizität

Das Konzept der Unterteilung von Th-Zellen in verschiedene, sich gegenseitig antagonisierende Zellreihen, welche jeweils für bestimmte Typen von Immunantworten oder pathologischer Prozesse verantwortlich sind (siehe Kapitel 1.1.3), erwies sich in den letzten Jahren als zu ungenau, um damit die komplexen *in vivo*-Vorgänge erklären zu können. Es wurde zunehmend in verschiedenen Studien von einer Plastizität der Zellreihen berichtet, das heißt, dass Zellen, welche eine Differenzierungsschiene eingeschlagen haben, sich umdifferenzieren können zu Zellen einer anderen Differenzierungsschiene.

So wurde beispielweise beschrieben, dass Th2-Zellen sich unter entsprechenden Th1- bzw. Th17-fördernden Bedingungen zu IL-4/IFN γ - oder IL-4/IL-17-koproduzierenden Zellen differenzieren können.^{68,69} Auch T_{reg}-Zellen als Zellreihe, der hauptsächlich suppressorische Eigenschaften zugesprochen werden, können infolge entsprechender Stimuli proinflammatorische Zytokine wie IFN γ oder IL-17 produzieren.^{70,71} Darüber hinaus existieren auch viele weitere Berichte über T-Zell-Plastizität, sodass insgesamt angenommen werden muss, dass wahrscheinlich alle bekannten Th-Zell-Differenzierungsformen ineinander umdifferenziert werden können, bzw. dass einzelne Zellen Charakteristika verschiedener Th-Zelltypen gleichzeitig besitzen können.

Diesbezüglich liegt derzeit besonderes Augenmerk auf Th17-Zellen, denen in Zusammenhang mit ihrer Fähigkeit, sich zu Th1/Th17-Zellen bzw. atypischen Th1-Zellen zu differenzieren, besondere Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen zugeschrieben wird (siehe Kapitel 1.2.4.1).

1.1.5 Lymphozytenmigration

Das Migrationsverhalten von Lymphozyten wird maßgeblich durch die Ausschüttung von Chemokinen und die Expression der entsprechenden Rezeptoren reguliert. Die Nomenklatur der Chemokine bzw. der Chemokinrezeptoren beruht auf deren molekularem Strukturschema, wobei die vier Gruppen CC, CXC, CX3C und XC beschrieben wurden (siehe Abbildung 1.2). Ein nachfolgendes R (z.B. CXCR) kennzeichnet einen Rezeptor, während ein L (z.B. CCL10) für einen Liganden, also das eigentliche Zytokin steht.

1 Einleitung

Neben dem Rückschluss über das Migrationsverhalten der jeweiligen Zelle kann anhand der Expression eines bestimmten Chemokinrezeptors oft auch auf den Zelltyp rückgeschlossen werden.



Abbildung 1.2

Molekulare Struktur der vier Chemokin-Klassen

Von links beginnend: CC, CXC, CX3C, XC

Zwischen den Kohlenstoffatomen bestehen Disulfidbrücken.
(Abbildung modifiziert nach Sahingur et al.⁷²)

CCR7

Der Chemokinrezeptor CCR7 dient in der Einwanderung von Immunzellen aus dem Blut in sekundär-lymphatische Organe und der richtigen Positionierung innerhalb dieser.^{39,73} Dabei binden die Zellen zuerst mittels CD62L an Oberflächenstrukturen auf hochendothelialen Venolen was zu einem Rollen der Zelle auf dem Endothel führt. Die anschließende Bindung von CCR7 an entsprechende Liganden auf dem Endothel setzt eine Kaskade von Vorgängen in Gang, welche zur Ausschleusung der Zelle aus dem Gefäß führt.^{4,73}

CCR7 wird als Marker für naive T_N und T_{CM} genutzt (siehe auch Kapitel 1.1.2.1).

CCR5, CCR6 und CXCR3

Neben Chemokinen und Chemokinrezeptoren, welche die Lymphozytenmigration in sekundäre lymphatische Organe regulieren existiert auch eine Vielzahl von Chemokinen/Chemokinrezeptoren, welche vor allem während aktivierter Immunreaktion von Bedeutung sind. Hierzu zählen unter anderem CCR5, CCR6 und CXCR3. Sie können die Einwanderung von Lymphozyten in entzündliches Gewebe fördern, wobei die Bedeutung davon je nach Art der Entzündung unterschiedlich ausgeprägt sein kann.^{4,39} Weiterhin spielen CCR5 und CXCR3 auch eine Rolle für die Migration von aktivierten Lymphozyten in reaktive Lymphknoten, was einerseits Bedeutung für die effiziente Aktivierung der erworbenen Immunreaktion auf einen Stimulus haben

1 Einleitung

kann, andererseits aber auch wichtig sein könnte, um eine in Gang gesetzte Immunreaktion wieder zu limitieren.⁴

Das Muster der Expression von CCR5, CCR6 und CXCR3 Chemokinrezeptoren kann Rückschlüsse auf die Differenzierung der Zelle zulassen, z.B. ob es sich um eine Th1- oder eine Th17-Zelle handelt (siehe auch Kapitel 1.1.3).

1.1.6 Autoimmunität

Während das Immunsystem unter physiologischen Umständen pathogene Organismen und krankhaft entartete körpereigene Zellen bekämpft, so gibt es auch eine Reihe von Krankheitsbildern, denen eine übersteigerte Aktivität des Immunsystems zugrunde liegt. Einen Großteil davon machen sogenannte Autoimmunerkrankungen aus, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass ihnen eine gestörte immunologische Selbsttoleranz zugrunde liegt, das heißt, dass das Immunsystem gesunde körpereigene Strukturen angreift.

Schätzungen gehen davon aus, dass etwa 5 – 10% der Weltbevölkerung an Autoimmunerkrankungen leiden, wobei die Inzidenz vieler Autoimmunkrankheiten in den vergangenen Jahren angestiegen ist.⁷⁴

Entsprechend der Komplexität des Immunsystems können den einzelnen Autoimmunerkrankungen Fehlfunktionen auf sehr unterschiedlichen Ebenen zugrunde liegen. Da Autoimmunerkrankungen oft auf ein einzelnes Organ begrenzt verlaufen, während andere Organe bzw. Gewebe keinen Schaden zu nehmen scheinen, liegt die Annahme nahe, dass ein spezifisches (körpereigenes) Antigen als Ziel fungiert. Somit ist insbesondere von einer pathogenen Rolle der (antigenspezifische) erworbene Immunreaktion auszugehen.

Einen Überblick über den aktuellen Wissensstand zur Rolle der erworbenen Immunreaktion bei T1DM gibt Kapitel 1.2.4.

1.1.7 Immunoseneszenz

Unter Immunoseneszenz versteht man Veränderungen des Immunsystems im Laufe des Lebens. Zu diesen „Alterserscheinungen“ zählen Charakteristika wie⁷⁵:

1 Einleitung

- Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten von CD45RA⁻CD45RO⁺ Zellen (Vermehrung der Memory-Zellen und vermindertes Vorkommen von naiven Zellen)
- verminderte Expression von CD28
- verminderte Expression von IL-2 und IL-2-Rezeptoren
- verminderte Expression von IL-7
- verminderte B-Zell-Funktion und B-Zell-Zahl
- relative Verminderung der Th1- und Verstärkung der Th2-Antwort

Die Veränderungen resultieren aus altersbedingten Verschiebungen in der T-Zell-Homöostase. Hierzu zählt in erster Linie die Verminderung der Ausreifung neuer T-Zellen aus dem Thymus sowie die kumulierenden Expositionen gegenüber infektiösen Agenzien und die Rolle von latent im Körper persistierenden Krankheitserregern, wobei hierbei besonders chronische Infektionen wie beispielsweise eine Infektion mit Zytomegalievirus (CMV) von Bedeutung sind. Durch die Verminderung des Zustromes naiver T-Zellen ist eine periphere T-Zell-Proliferation nötig, um eine adäquate Gesamtzellzahl im peripheren T-Zell-Pool aufrechtzuerhalten. Außerdem fördert die repetitive Exposition zu (chronischen oder latenten) Infektionen die Proliferation der entsprechenden Gedächtniszellen, sodass insgesamt eine quantitative Verschiebung von naiven Zellen zu Gedächtniszellen folgt.^{75,76}

Immunoseneszenz wurde auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis und der Juvenilen Idiopathischen Arthritis beschrieben.^{75,77,78} Interessanterweise wurde jedoch für T1DM eine Reversibilität dieser Immunoseneszenz im Krankheitsverlauf beobachtet, welche möglicherweise auf die Insulinzufuhr zurückzuführen ist.⁷⁹

1.2 Diabetes mellitus im Kindesalter

1.2.1 Epidemiologie und Formen

Unter dem Begriff Diabetes mellitus werden eine Vielzahl ätiopathogenetisch unterschiedlicher Krankheitsbilder zusammengefasst, die sich alle durch eine krankhafte Erhöhung des Blutglukosespiegels auszeichnen. Die im Kindesalter

1 Einleitung

und in der Adoleszenz am häufigsten auftretende Form stellt dabei der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) dar. Er wurde früher auch als insulinabhängiger oder juveniler Diabetes bezeichnet, was jedoch mittlerweile zunehmend verlassen wird, da einerseits auch andere Formen des Diabetes mellitus der Therapie mit Insulin bedürfen können und andererseits der T1DM auch erst im Erwachsenenalter manifest werden kann (dann als *late onset autoimmune diabetes in the adult* (LADA) bezeichnet).

In Deutschland wird derzeit von ungefähr 30.000 an T1DM erkrankten Kinder im Alter von 0 - 19 Jahren ausgegangen mit einer geschätzten Inzidenzrate von 24,4/100.000 Personenjahre (PJ) bei Kindern unter 15 Jahren.^{80,81} Im weltweiten Vergleich weisen äquatornahe gelegene Länder sowie Länder mit niedrigem Lebensstandard in der Regel niedrige Inzidenzen für T1DM auf (ca. 0,1/100.000 PJ in China und Venezuela), während die höchsten Inzidenzraten aus Finnland berichtet werden (40 - 50/100.000 PJ).^{82,83} Dabei stellte die international angelegte DIAMOND Studie, die epidemiologische Daten für Kinder bis einschließlich des 15. Lebensjahres in den Jahren 1990 bis 1999 auswertete, einen durchschnittlich 2,8% betragenden Anstieg der jährlichen Inzidenzraten fest.⁸² Ähnliche Zahlen wurde auch im Rahmen der europaweit angelegten EURODIAB Studie 2009 veröffentlicht, wobei vor allem für jüngere Patienten ein stärkerer Anstieg beobachtet wurde.⁸³ Ätiopathogenetisch liegt dem T1DM eine Autoimmunreaktion zugrunde, welche in Kapitel 1.2.4 genauer beleuchtet werden soll.

Eine weitere Form des Diabetes mellitus ist der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM), welcher lange Zeit als Erkrankung des Erwachsenenalters angesehen wurde, allerdings zunehmend auch im Kindesalter diagnostiziert wird. So stellte er in den USA bereits 2001 mit einer Prävalenz von rund 22 Fällen pro 100.000 Jugendlichen eine zunehmend bedeutsame Entität dar.⁸⁴ In Deutschland wurde hingegen ein weitaus geringerer Prävalenzanstieg beobachtet. 2009 wurde in Baden-Württemberg die Prävalenz des T2DM bei Personen unter 20 Jahren auf 2,3 Fälle pro 100.000 Einwohner bemessen, womit er aktuell in Deutschland im Kindes- und Jugendalter noch eine seltene Krankheit darstellt.⁸⁵ Ätiopathogenetisch liegt dem T2DM eine periphere

1 Einleitung

Resistenz der Zielzellen gegenüber Insulin zugrunde, die sich in der Regel als Folge eines starken Übergewichtes und damit konsekutiv verbundener gesteigerter Insulinproduktion und –ausschüttung entwickelt, wobei irgendwann die Resistenz gegenüber der gesteigerten Ausschüttung überwiegt und es somit zum relativen Insulinmangel kommt.

Weitere Formen des Diabetes mellitus stellen im Kindesalter eine Rarität dar, weswegen im aktuellen Kontext auch nicht weiter darauf eingegangen werden soll.

Im Folgenden wird im Rahmen der hier vorliegenden Studie spezifisch auf den T1DM eingegangen.

1.2.2 Klinik des Diabetes mellitus Typ 1

Da ein T1DM eine eher seltene Diagnose darstellt, sind aktuell keine umfassenden Früherkennungsprogramme etabliert. Somit stellen sich die betroffenen Patienten meist erst bei deutlich ausgeprägter Symptomatik vor. Hierzu zählen in erster Linie Polyurie mit konsekutiver Polydipsie, sowie Abgeschlagenheit und Gewichtsabnahme.

Die erhöhte Harnfrequenz ist dabei auf osmotische Diurese zurückzuführen. Die renalen Transportsysteme können die im Primärharn vermehrt anfallende Glukose nicht vollständig rückresorbieren, sodass diese im Tubulussystem verbleibt und dort osmotisch Wasser mit sich zieht. Zur Gewichtsabnahme kommt es, da Insulin nicht nur den Glukosehaushalt maßgeblich beeinflusst, sondern auch eines der stärksten anabol wirksamen Hormone des menschlichen Körpers ist, dessen Mangel somit eine katabole Stoffwechsellage begünstigt.⁸⁶

Weitere mögliche Symptome umfassen eine perineale Candidose als Folge der mit Diabetes mellitus einhergehenden leichten Immunschwäche sowie möglicherweise auch verschwommenes Sehen (im Extremfall sogar Katarakt) aufgrund der osmotischen Verschiebungen innerhalb der Augenlinse bei Hyperglykämie.^{87,88}

Oft präsentiert sich die Krankheit allerdings auch wesentlich dramatischer. Bei plötzlich gesteigertem Metabolismus (z.B. infolge von Alkoholkonsum) unter gleichzeitig bestehendem absolutem Insulinmangel kann es zur rasanten

1 Einleitung

Verschlechterung des Allgemeinzustandes bis hin zum hyperglykämischen ketoazidotischen Koma kommen (je nach Region bis zu 40% der Erstmanifestationen⁸⁹). Für den T1DM ist dabei die gleichzeitige Förderung der Lipolyse mit vermehrtem Anfall von Ketonkörpern und konsekutiver Azidose typisch, was bei T2DM in der Regel durch die noch verbleibende Insulinwirkung verhindert wird. Klinisch kann dies beim T1DM zur Kußmaul-Atmung und einem charakteristischen Acetongeruch der Atemluft führen.

Eine Diagnose bei asymptomatischen Patienten stellt eher eine Seltenheit dar und tritt vor allem bei Verwandten von Typ 1-Diabetikern, falls diese routinemäßig getestet werden, sowie im Rahmen von Studien an T1DM als Zufallsbefund auf.⁸⁹

Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Häufigkeit der Symptome bei Diagnosestellung (in Anlehnung an eine finnische Studie aus dem Jahr 2005⁹⁰).

Tabelle 1.1 Häufigkeiten der Symptome bei T1DM-Diagnosestellung

Die Häufigkeitsangaben schwanken je nach Quelle, jedoch zählen Polyurie/Polydipsie gefolgt von Gewichtsverlust stets zu den häufigsten. (modifiziert nach Roche et al.⁹⁰)

Symptom	Häufigkeit
Polyurie/Polydipsie	ca. 60-70%
Enuresis	ca. 15-30%
Gewichtsverlust	ca. 20-40%
Lethargie	ca. 10-20%
rezidivierende Infektionen	ca. 0-2%

Neben den akuten Symptomen und Gefahren der Hyperglykämie besteht für Diabetiker auch die Gefahr der Entwicklung von Folgeerkrankungen des chronisch gestörten Glukosemetabolismus. Hierzu zählen die diabetische Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie sowie ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Herzinfarkt, Schlaganfall oder andere makroangiopathische Komplikationen). Da die Geschwindigkeit der Entwicklung aller Folgeerkrankungen in direkter Korrelation zum Blutglukosespiegel (BGS) steht, ist die bestmögliche Normalisierung des BGS das höchste Therapieziel.⁸⁹

1.2.3 Diagnostik des Diabetes mellitus Typ 1

Die Diagnose „Diabetes mellitus“ beruht neben der klinischen Präsentation in erster Linie auf der Messung des Hämoglobins A1c (HbA1c) und des venösen

1 Einleitung

BGS, entweder als Nüchternblutzucker oder Gelegenheitsblutzucker oder im Rahmen eines oralen Glukose-Toleranz-Tests (oGTT). Beim oGTT nimmt der Patient eine definierte Menge Glukose oral auf (1,75g/kg Körpergewicht; maximal 100g) und es wird anschließend der BGS nach jeweils definierten Zeiten (0min, 30min, 1h, 2h, 3h) gemessen.

Die Diagnose „Diabetes mellitus“ wird entsprechend der Kriterien in Tabelle 1.2 gestellt (nach den Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft von 2013⁹¹ bzw. den Empfehlungen der American Diabetes Association von 2011⁹²).

Tabelle 1.2 Diagnosekriterien eines Diabetes mellitus

Diese Kriterien unterscheiden nicht zwischen den Diabetes-Typen (modifiziert nach den Empfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft bzw. der American Diabetes Association^{91,92}).

Stellenwert	Test	Grenzwert
1. Wahl	HbA1c-Messung*	≥ 6,5% (48mmol/mol)
2. Wahl	Nüchtern-BGS*	≥ 126mg/dl (7,0mmol/l)
	oGTT-BGS nach 2h*	≥ 200mg/dl (11,1mmol/l)
Alternative	Gelegenheits-BGS ≥ 200mg/dl + typische Klinik	

* Test sollte zur Diagnosesicherung zweimal positiv sein

Ist ein Diabetes mellitus diagnostiziert, so ist nachfolgend zwischen den Subtypen zu unterscheiden (v.a. zwischen T1DM und T2DM).⁹¹ Dies geschieht in der Regel klinisch. Für einen T1DM spricht dabei ein junges Manifestationsalter mit ausgeprägter, akut einsetzender Klinik und eher schlankem Habitus. Für einen T2DM sprechen ein spätes Manifestationsalter, ein adipöser Habitus sowie schleichend einsetzende Klinik.

Sollte die klinische Unterscheidung nicht sicher möglich sein, so können zusätzlich laborchemische Tests eingesetzt werden. Hierzu zählen der Nachweis von Antikörpern gegen GAD65 (*glutamic acid decarboxylase*), IA-2 (das 40K Fragment der Tyrosinphosphatase), Insulin oder ZnT8 (Zink-Transporter 8).^{91,93} Antikörper sind bei 90-95% aller T1DM-Erstmanifestationen nachweisbar. Weiterhin bestehen beim T1DM auch inadäquat niedrige Spiegel von Insulin und C-Peptid, welches als Spaltprodukt bei der Insulin-Synthese entsteht.⁹¹

1 Einleitung

Nach Diagnosestellung eines T1DM, sowie in regelmäßigen Abständen im weiteren Krankheitsverlauf muss durch ophthalmologische, neurologische und nephrologische Untersuchungen nach eventuell auftretenden Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus gefahndet werden. Ebenso sollte an die mögliche Manifestation assoziierter Krankheitsbilder wie beispielsweise Autoimmunthyreopathien und Zöliakie gedacht werden.⁹³ Die regelmäßige Kontrolle von HbA1c (halbjährlich) und BGS (im Tagesprofil) ist außerdem wichtig zur Beurteilung des Therapieerfolges im weiteren Krankheitsverlauf.

1.2.4 Autoimmunpathogenese des Diabetes mellitus Typ 1

Der T1DM zeichnet sich durch eine ausgeprägte autoimmunologische Reaktion aus, welche gegen die Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas gerichtet ist. Infolge der resultierenden Schädigung der β -Zellen entwickelt sich dabei eine zunehmende Unfähigkeit des Organes, ausreichende Mengen an Insulin zu produzieren und in den Kreislauf abzugeben, wodurch es zu einem absoluten Insulinmangel mit den entsprechenden klinischen Folgen kommt.⁹⁴

Als morphologisches Korrelat der autoimmunologischen Reaktion gegen die β -Zellen kann ein aus $CD4^+$ Lymphozyten, $CD8^+$ Lymphozyten, B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen bestehendes Infiltrat der Langerhans-Inseln des Pankreas beobachtet werden, welches als „Insulitis“ bezeichnet wird.⁹⁵ Im Rahmen dieser lymphoiden Infiltration werden verschiedene proinflammatorische Zytokine, Granzym B und Perforin freigesetzt, die zur Schädigung der β -Zellen oder zu einem (potenziell reversiblen) Funktionsverlust dieser führen.^{96,97} Dabei scheinen vor allem $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten die pathogenetisch größte Bedeutung zu haben⁹⁴, wobei die genauen zugrundeliegenden Mechanismen Gegenstand aktueller Forschung sind. Bemerkenswerterweise kann Insulitis vor allem bei neu diagnostiziertem T1DM beobachtet werden und das Ausmaß der Infiltration durch $CD8^+$ und B-Zellen nimmt mit abnehmender Menge an funktionierenden β -Zellen ebenfalls ab.⁹⁸

1.2.4.1 Rolle von $CD4^+$ T-Zellen bei Diabetes mellitus Typ 1

Im Rahmen mehrerer Studien wurden Hinweise darauf gefunden, dass bestimmte T-Zell-Populationen bei autoimmun erkrankten Patienten im

1 Einleitung

Vergleich zu Gesunden verändert sind und somit pathogenetisch wichtig sein könnten. Th1-Zellen spielen im Rahmen der zellulären Immunantwort eine wichtige Rolle³⁴, was in Studien beobachteten Veränderungen dieser Zellgruppe im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen besondere Bedeutung verleiht. Beispielsweise wurde für T1DM, Rheumatoide Arthritis und Systemischen Lupus erythematoses in verschiedenen Studien erhöhte IFN γ -Expression beobachtet.³⁸ Im Mausmodell konnte außerdem Diabetes mellitus durch den Transfer pathogener Th1-Zellen induziert werden, während dies mit Th2-Zellen nicht gelang.^{99,100} Es gab sogar Hinweise darauf, dass IL-4 als Vertreter einer Th2-Antwort mit protektiven Effekten in Zusammenhang steht.¹⁰¹ Die Beobachtungen dieser älteren Studien zur Rolle von Th1-Zellen in Autoimmunerkrankungen wurden mit der Entdeckung und weiteren Charakterisierung von Th17-Zellen in ein neues Licht gerückt. Für Th17-Zellen wurden ebenso Hinweise auf deren mögliche Beteiligung an Autoimmunkrankheiten wie Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis gefunden.^{34,44} Es liegen jedoch Hinweise darauf vor, dass nicht alle Untergruppe der Th17-Zellen pathogenes Potenzial aufweisen, sondern dieses durch unterschiedliche Einflüsse verändert werden kann.^{102,103}

Die Unterscheidung, ob autoimmune Pathogenität vor allem von Th17-Zellen oder eher von Th1-Zellen ausgeht, wird außerdem erschwert durch das hohe Potenzial von Th17-Zellen, sich zu Th17/Th1-Zellen oder sogar zu reinen Th1-Zellen zu differenzieren. Sowohl bei juveniler idiopathischer Arthritis, als auch bei autoimmuner Polyarthritiden wurden in der Synovia Th17/Th1-Zellen oder Th1-Zellen, welche aus Th17-Zellen hervorgegangen waren, gefunden.^{54,104} In Mausmodellen des T1DM wurde ebenfalls eine rapide Differenzierung transferierter pathogener Th17-Zellen zu Th1-Zellen beobachtet und gleichzeitig nachgewiesen, dass nur die Blockade des konsekutiv freigesetzten IFN γ , nicht jedoch eine IL-17-Blockade die Krankheitsübertragung verhindern kann.¹⁰⁵ In einer weiteren Studie wurde im Mausmodell gezeigt, dass Th17-Zellen zwar eine Entzündung des Pankreas bewirken, jedoch ein Diabetes mellitus sich nur ausbildet, wenn diese Zellen zu IFN γ -produzierenden

1 Einleitung

Zellen differenzieren.¹⁰⁶ Ob und inwiefern Th17-Zellen eine Rolle in der Pathogenese des T1DM spielen ist jedoch anhand dieser Daten nicht zu beantworten und Gegenstand aktueller Forschung.

Neben Th1- und Th17-Zellen werden auch T_{reg} ausführlich im Zusammenhang mit Autoimmunität untersucht. Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass FoxP3-Mutationen zu dem durch multiple autoimmune Reaktionen gekennzeichneten IPEX-Syndrom führen (IPEX = *immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), im Rahmen dessen es auch zur Manifestation eines Diabetes mellitus kommt. In einer Vielzahl an Studien, welche die Rolle von T_{reg} für den T1DM untersucht haben, waren die Ergebnisse bislang so unterschiedlich und teilweise widersprüchlich, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt keine klare Aussage darüber getroffen werden kann. Es ist derzeit anzunehmen, dass dem T1DM weder eine quantitative Veränderung der T_{reg}, noch eine primär gestörte suppressive Funktion zugrunde liegt. Möglicherweise könnten veränderte Migrationsfähigkeiten der T_{reg} oder ein durch das entzündliche Milieu im Pankreas bedingter Verlust der suppressiven Funktion der T_{reg} vorliegen.¹⁰⁷ Dies ist jedoch aktuell nicht hinreichend untersucht.

1.2.4.2 Rolle von CD8⁺ T-Zellen bei Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM)

Eine potenziell pathogene Bedeutung wurde nicht nur für CD4⁺ T-Zellen beschrieben, sondern ebenso für CD8⁺ T-Zellen. Es wird sogar vermutet, dass die weitreichende Destruktion pankreatischen Gewebes bei T1DM vor allem durch CD8⁺-T-Zell-vermittelte Prozesse zustande kommt und autoreaktive CD4⁺ T-Zellen zwar gleichzeitig vorliegen, jedoch weniger destruktiv sind.^{96,108} Diese These wird unter anderem gestützt durch die Beobachtung, dass im peripheren Blut autoreaktive CD4⁺ T-Zellen sowohl bei T1DM als auch bei T2DM nachgewiesen werden können, während der Nachweis autoreaktiver CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut spezifisch ist für T1DM.¹⁰⁸ Vor kurzer Zeit wurden in einer Studie autoreaktive CD8⁺ T-Zellen im Pankreas nachgewiesen und dabei handelte es sich um den ersten direkten Nachweis autoreaktiver Zellen im Pankreasgewebe von T1DM überhaupt.¹⁰⁹

1 Einleitung

In der histologischen Betrachtung repräsentieren CD8⁺ T-Zellen den zahlenmäßig größten Teil des insulinitischen Infiltrates und es wurde beschrieben, dass das Ausmaß der Infiltration durch CD8⁺ T-Zellen vor allem zum Zeitpunkt massiver β -Zell-Schädigung am größten ist.⁹⁸ Dies steht im Einklang mit der für T1DM typischen Überexpression von MCH-I und Fas auf der β -Zell-Oberflächen, wodurch diese Zellen empfindlicher gegenüber CD8⁺-T-Zell-vermittelter Zytotoxizität werden.^{97,98}

Wie auch schon bei CD4⁺ T-Zellen, gelang bereits die experimentelle Übertragung von Diabetes mellitus durch Transfer pathogener CD8⁺ T-Zellen im Mausmodell.¹¹⁰

1.2.5 Therapie des Diabetes mellitus Typ 1

Im Zentrum der Therapie des T1DM steht der Ausgleich des Insulinmangels durch exogene Substitution. Dabei ist aktuell die sogenannte „intensivierte Insulintherapie“ die Methode der Wahl.¹¹¹ Hierbei erhält der Patient eine bestimmte Menge eines langwirksamen Insulins („Basalinsulin“), welches einen Basisspiegel im Körper aufrechterhält. Dieses Basalinsulin verabreicht sich der Patient morgens und abends, wobei die Gesamtmenge etwa 30 – 40% des Insulin-Tagesbedarfs beträgt.^{93,112} Zusätzlich muss er sich bei Aufnahme größerer Nahrungsmengen, also zum Frühstück, Mittagessen und Abendbrot, kurzwirksames Insulin („Prandialinsulin“) zuführen, welches den postprandialen Blutzuckeranstieg kompensiert. Die Menge des zu verabreichenden Prandialinsulin ist dabei neben patienteneigenen Faktoren maßgeblich abhängig von der Art der zugeführten Nahrungsmittel und muss zu jeder Mahlzeit einzeln berechnet werden. Dies geschieht mithilfe eines Schemas, welches für jeden Patienten individuell erarbeitet werden muss und ihm angibt, wieviel Insulin er sich pro aufgenommener Broteinheit (BE; 1 BE entspricht 12g blutzuckerwirksamer Kohlenhydrate) oder Kohlenhydrateinheit (KE; 1 KE entspricht 10g blutzuckerwirksamer Kohlenhydrate) zuführen soll. Meist liegen die Dosierungen des Prandialinsulins bei 1 – 2 IE/KE, wobei sie morgens meist höher gewählt werden muss als mittags und abends wiederum zwischen der morgendlichen und abendlichen Dosierung liegt.⁹³

1 Einleitung

Zusätzlich zu Basis- und Prandialinsulin muss außerdem noch ebenfalls zu den Mahlzeiten eine gewissen Menge Insulin zugeführt oder von der errechneten Dosis Prandialinsulin abgezogen werden („Korrekturinsulin“), je nachdem, welcher BGS präprandial gemessen wurde. Die Dosierung des Korrekturinsulins richtet sich nach der Differenz des aktuellen und des erwünschten BGS und der individuellen Insulinempfindlichkeit.⁹³

Eine relativ neue Form der Insulinsubstitution ist die Anwendung einer Insulinpumpe, welche kurzwirksames Insulin kontinuierlich in den Körper abgibt und per Knopfdruck zusätzlich Boli injizieren kann. Das grundlegende Prinzip ist dabei ähnlich der gerade beschriebenen Therapie.

Um eine angemessene Compliance der Patienten zu erreichen sind Schulungen, in denen den Patienten detailliert beigebracht wird, wie sie mit der Krankheit und deren Therapie umgehen müssen, essentiell. Weiterhin ist eine psychosoziale Betreuung wichtiger Bestandteil der Diabetestherapie. Entgegen der früher vorherrschenden Meinung, Typ 1-Diabetiker müssten eine spezielle Diät einhalten, wird aktuell empfohlen, keine speziellen Ernährungspläne zu erstellen, sondern lediglich das Insulindefizit wie oben erläutert auszugleichen.¹¹¹

Zusätzlich zur Insulintherapie spielt auch die Therapie der Folgeerkrankungen eine wichtige Rolle (z.B. ACE-Hemmer bei Niereninsuffizienz), worauf jedoch hier nicht genauer eingegangen werden soll.

2 Zielsetzung dieser Arbeit

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl immunologischer Studien an verschiedenen Autoimmunerkrankungen durchgeführt. Oft wurde dabei nach Veränderungen phänotypischer und funktioneller Charakteristika von Lymphozyten gesucht, mit dem Ziel, mehr Klarheit über ätiopathogenetische Vorgänge der jeweiligen Erkrankungen zu gewinnen und dadurch potenzielle therapeutische Ansatzpunkte zu erkennen. Dies war auch Ziel unserer Studie.

In unserer Studie wurde T1DM als Vertreter der Gruppe der Autoimmunerkrankungen untersucht. Trotz intensiver Forschung sowohl an murinen, als auch an humanen Lymphozyten sind die in früheren Studien gesammelten Ergebnisse nach wie vor schwierig zu interpretieren und es stehen noch viele Fragen offen. Für viele Studien war und ist die Durchflusszytometrie eine wichtige Methode zur Charakterisierung der Lymphozyten. Diese Methode haben auch wir angewendet, wobei wir im Gegensatz zu vielen zurückliegenden Studien die Vorteile der bei neueren Durchflusszytometern möglichen synchronen Färbung von bis zu sechs Farbstoffen nutzen konnten, um detailliertere Charakterisierungen der verschiedenen Lymphozytenpopulationen durchzuführen.

Die vorliegende Promotionsarbeit verfolgte die Idee, dass man an Lymphozyten aus dem peripheren Blut veränderte Expression von Oberflächenproteinen (v.a. von Chemokinrezeptoren) und/oder veränderte Produktion von Zytokinen feststellen kann, die eine proinflammatorische autoimmune Reaktion begünstigen könnten und somit potenzielle Therapieziele darstellen. Insbesondere wurden die Lymphozyten dabei in einzelne Subpopulation unterteilt, was aufgrund technischer Limitierungen in vielen früheren Studien nicht so detailliert möglich war. Dadurch bestand die Möglichkeit, Veränderungen zu sehen, welche sich bei einer weniger detaillierten Aufteilung in die einzelnen Subpopulationen weniger deutlich abzeichnen und somit übersehen werden könnten.

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Basierend auf Vorstudien^{78,79} war das Ziel der vorliegenden Arbeit die deskriptive Analyse der T-Zell-Subpopulationen, die Untersuchung deren Chemokinrezeptorprofils und deren intrazellulärer Zytokinproduktion insbesondere in Hinblick auf pro-inflammatorische IL-17- und IFN γ -produzierende T-Zellen und demografische (z. B. Alter) sowie krankheitsspezifische Parameter (z. B. Krankheitsdauer).

Die Hypothese bestand darin, dass T1DM einen höheren proportionalen Anteil von Th17 und Th1 Zellen im peripheren Blut aufweisen als altersgleiche Kontrollpersonen.

Null-Hypothese H0: % Th17- bzw. Th1-Zellen in T1DM = % Th17- bzw. Th1-Zellen in gesunden Kontrollpersonen.

Alternativ-Hypothese H1: % Th17- bzw. Th1-Zellen in T1DM \neq % Th17- bzw. Th1-Zellen in gesunden Kontrollpersonen.

Ausgehend von einer statistischen Power von 80% und einem Alpha-Fehler von 5% erfolgte eine Fallzahlschätzung basierend auf den Vorstudien von Hofer et al.⁷⁹

3 Materialien und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1 Patientenkohorte

Es wurden insgesamt 30 Patienten mit der Diagnose eines T1DM in der diabetologischen Sprechstunde der Universitäts-Kinderklinik, sowie in der Pädiatrischen Praxis Frau Dr. Lieb in Würzburg rekrutiert. Diese Patientenkohorte wurde zur Klärung der Fragestellung der Studie weiter unterteilt in eine Gruppe von Patienten mit neu diagnostiziertem (engl.: *recent onset*) T1DM (T1DM RO) und eine zweite Gruppe von Patienten mit bereits seit längerem bestehendem (engl.: *long standing*) T1DM (T1DM LS). Die zeitliche Grenze, ab der T1DM als T1DM LS angesehen wird, variiert in der Literatur zwischen wenigen Tagen und ca. 6 Monaten.¹¹³⁻¹¹⁸ In der aktuellen Studie wurden Probanden bis zu einer Krankheitsdauer von 6 Wochen als T1DM RO eingeteilt, was auch der von Waid et al. angewandten Grenze entspricht.

Einschlusskriterium war die dokumentierte Diagnose eines T1DM. Ausschlusskriterien waren schwere, behandlungsbedürftige Infektionen innerhalb der letzten drei Monate, maligne Erkrankungen und komplexe und monogenetische syndromale Erkrankungen, sowie Medikamente, die nachweislich das Immunsystem beeinflussen (z. B. Glukokortikoide, Immunsuppressive, Zytostatika) und schwere, behandlungsbedürftige Allergien. Die Kontrollgruppe bestand aus 53 als immunologisch gesund erachteten Patienten, welche in der Endokrinologischen Sprechstunde und auf den Stationen der Universitäts-Kinderklinik Würzburg, sowie in der Universitäts-Kinderchirurgie Würzburg rekrutiert wurden. Die Blutproben der Kontrollgruppe wurden teilweise durch andere Labormitarbeiter verarbeitet und asserviert, jedoch stets nach dem gleichen Protokoll. Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe waren Autoimmunerkrankungen sowie alle Ausschlusskriterien, die auch für die T1DM-Gruppe galten.

3 Materialien und Methoden

Aufgrund des bei Kindern oft nur in geringen Menge zur Verfügung stehenden Probenmaterials konnten nicht für alle Proben alle Messungen durchgeführt werden.

3.1.2 Ethikvotum, Patientenaufklärung und Blutentnahme

Die Durchführung dieser prospektiven Fall-Kontroll-Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Protokollnummer 239/10). Alle Probanden wurden persönlich sowie im Falle der Minderjährigkeit in Anwesenheit eines Erziehungsberechtigten über die Studie aufgeklärt. Schriftliches Einverständnis der Probanden bzw. der Erziehungsberechtigten zur Teilnahme an der Studie lag vor. Die Entnahme der Blutproben erfolgte gemäß den üblichen klinischen Standards. Die Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki 2011 durchgeführt.

3.2 Medien, Substrate und Gerätschaften

Materialien und Geräte sind in den Tabellen 3.1 bis 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.1 Medien und Medienzusätze

Medium / Zusatz	Hersteller bzw. Zusammensetzung
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco® by Life Technologies* ¹ Ref.: 18912-012
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Feinbiochemica* ² Cat.: 20385
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom* ³ , Cat.: S 0615
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich* ⁴ , Cat.: 031M0786
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich* ⁴ , Cat.: A7906-50G
RPMI-1640	Sigma-Aldrich* ⁴ , Cat.: R8758
Nährmedium	RPMI + 10% FCS + 1% P/S
Einfriermedium	RPMI + 20% FCS + 10% DMSO

*¹ Life Technologies, Carlsbad, USA

*² Serva Feinbiochemica GmbH und Co KG, Heidelberg, Deutschland

*³ Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

*⁴ Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

3 Materialien und Methoden

Tabelle 3.2 Chemikalien

Substanz / Reagenz	Hersteller
Ficoll	Linaris GmbH* ¹ , Cat.: GTF1511YK
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich* ⁴ , Cat.: S2002
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA* ² , Cat.: A320145 136
steriles Wasser (Aqua dest.)	Fresenius Kabi* ³ , Ref.: 1080181
isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	Fresenius Kabi* ³
Kaliumbicarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich* ⁴ ; Cat: P9144
Trypanblau	Merck* ² , Cat.: L288532
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich* ⁴ , Cat.: E-5134
* ¹	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland
* ²	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
* ³	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg v. d. Höhe, Deutschland
* ⁴	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Tabelle 3.3 Puffer

Puffer	Hersteller bzw. Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS + 0,5% BSA + 0,01% NaN ₃
Permeabilisierungspuffer	BioLegend* ¹ , Cat.: 421002 1:10 verdünnt mit Aqua dest.
Permeabilisierungspuffer	eBioscience* ² , Cat.: 00-8333 1:10 verdünnt mit Aqua dest.
Fixationspuffer	BioLegend* ¹ , Cat.: 420801
Fixationspuffer	eBioscience* ² , Cat.: 00-8222
Erythrozyten-Lyse-Puffer	1000ml Aqua dest. + 8,26g NH ₄ Cl + 1g KHCO ₃ + 0,037g EDTA
* ¹	BioLegend, San Diego, USA
* ²	eBioscience, Frankfurt a.M., Deutschland

Tabelle 3.4 Stimulantien

Stimulanz	Hersteller
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich* , Cat.: P81391-1MG
Ionomycin	Sigma-Aldrich* , Cat.: IO634
Brefeldin A	Sigma-Aldrich* , Cat.: B6542
*	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

3 Materialien und Methoden

Tabelle 3.5 Antikörper

APC-konjugierte Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CD19	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD19 (Klon HIB19)	BioLegend* ²
anti-human CD4	monoklonaler Maus-IgG2b-Antikörper gegen humanes CD4 (Klon OKT4)	eBioscience* ³ bzw. BioLegend* ²
anti-human CD161	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD161 (Klon DX12)	BD* ¹
anti-human RORγt	monoklonaler Ratten-IgG2a-Antikörper gegen humanes RORγt (Klon AFKJS-9)	eBioscience* ³
anti-human IL-4	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes IL-4 (Klon 8D4-8)	BD* ¹ bzw. BioLegend* ²
IgG1 Isotyp-Kontrolle	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper Isotyp-Kontrolle (Klon MOPC-21)	BD* ¹
APC-Cy7-konjugierte Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CCR5	monoklonaler Maus-IgG2a-Antikörper gegen humanes CCR5 (Klon: 2D7/CCR5)	BD* ¹
PerCP-konjugierte Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CD8	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD8 (Klon SK1)	BD* ¹
PerCP-Cy5.5-konjugierte Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CCR6	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CCR6 (Klon 11A9)	BD* ¹
anti-human CXCR3	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CXCR3 (Klon 1C6/CXCR3)	BD* ¹

3 Materialien und Methoden

PE-konjugierter Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CD4	monoklonaler Maus-IgG2b-Antikörper gegen humanes CD4 (Klon OKT4)	BioLegend* ²
anti-human CD8	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD8 (Klon SK1)	BioLegend* ²
anti-human CD45RO	monoklonaler Maus-IgG2a-Antikörper gegen humanes CD45RO (Klon UCHL-1)	eBioscience* ³ bzw. BD* ¹
anti-human CD56	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD56 (Klon HCD56)	BioLegend* ²
anti-human CD62L	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD62L (Klon DREG-56)	BioLegend* ²
anti-human CD127	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD127 (Klon eBioRDR5)	eBioscience* ³
IgG1 Isotyp-Kontrolle	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper Isotyp-Kontrolle (Klon MOPC-21)	BD* ¹
FITC-konjugierte Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CD3	monoklonaler Maus-IgG2a-Antikörper gegen humanes CD3 (Klon HIT3a)	BioLegend* ²
anti-human CD25	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD25 (Klon 2A3)	BD* ¹
anti-human CD45RA	monoklonaler Maus-IgG2b-Antikörper gegen humanes CD45RA (Klon HI100)	eBioscience* ³ bzw. BioLegend* ²
anti-human IFN γ	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes IFN γ (Klon 4S.B3)	BioLegend* ²
anti-human TNF α	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes TNF α (Klon 6401.1111)	BD* ¹

3 Materialien und Methoden

IgG1 Isotyp Kontrolle	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper Isotyp Kontrolle (Klon MOPC-21)	BD* ¹
Horizon-V450 kon- jugierte Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CD28	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes CD28 (Klon CD28.2)	BD* ¹
Alexa Fluor 700- kon- jugierte Antikörper	Eigenschaften / Klon	Hersteller
anti-human CCR7	monoklonaler Maus-IgG2a-Antikörper gegen humanes CCR7 (Klon 150503)	BD* ¹
anti-human IL-17A	monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper gegen humanes IL-17A (Klon BL168)	BioLegend* ²
* ¹	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	
* ²	BioLegend, San Diego, USA	
* ³	eBioscience, Frankfurt a.M., Deutschland	

Tabelle 3.6 Gerätschaften

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifugen	Universal 32R Rotanta/K	Hettich* ¹ Hettich* ¹
Vortex Mixer		Retsch* ²
Gefrierschränke	Comfort HERAfreeze™ HFU586 Basic	Liebherr* ³ Thermo Scientific* ⁴
Inkubator	Heraeus	Thermo Scientific* ⁴
Wasserbad	Typ 1003	GFL* ⁵
sterile Werkbank	Gelaire® BSB6A und	Flow Laboratories* ⁶
Durchflusssysteme	FACS Canto II	BD* ⁷
Pipetten	Research (2,5µl) und Research plus (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf* ⁸

3 Materialien und Methoden

Pipettierhilfen	Pipetboy	Integra* ⁹
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Superior Marienfeld * ¹⁰
Stickstofftank	Cryoson Typ 200VL/R	Consarctic* ¹¹

- *1 Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
- *2 Retsch GmbH, Haan, Deutschland
- *3 Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
- *4 Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts
- *5 Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co, Burgwedel, Deutschland
- *6 Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland
- *7 BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- *8 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- *9 Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
- *10 Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
- *11 Consarctic Entwicklung und Handels GmbH, Westerngrund, Deutschland

Tabelle 3.7 Laborbedarf

Artikel	Typ	Hersteller
Stangenpipetten	Cellstar® (10ml)	Greiner bio-one* ¹
	Glaspipetten (5ml, 10ml, 20ml)	Superior Marienfeld* ²
Pipettenspitzen		Sarstedt* ³
Zentrifugenröhrchen	Cellstar® Tubes (50ml)	Greiner Bio-One* ¹
Mikrozentrifugenröhrchen	SafeSeal (1,5ml, 2ml)	Sarstedt* ³
Kryoröhrchen	Cyro.S™ (2ml)	Greiner Bio-One* ¹
Petrischalen	Cellstar® Cell culture dish (60 x 15mm)	Greiner Bio-One* ¹
Einmalhandschuhe	SensiCar Ice	Medline* ⁴

- *1 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- *2 Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
- *3 Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
- *4 Medline Industries Inc., Mundelein, Illinois

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung und Kryokonservierung der mononukleären Zellen des peripheren Vollblutes

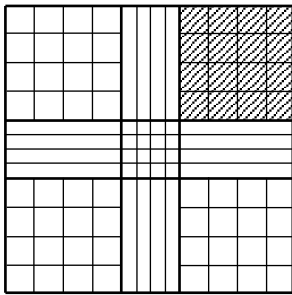
Aus dem von den Probanden gewonnenen Vollblut wurden innerhalb von 24h die mononukleären Zellen des peripheren Vollblutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) isoliert.

Hierzu wurden Ficoll in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben und im Verhältnis 1:2 mit dem Vollblut überschichtet. Anschließend wurde das Röhrchen für 25min bei 1500rpm ohne Bremse zentrifugiert, wodurch sich vier Phasen bildeten. Die entstandene Schicht aus PBMC konnte mithilfe einer Glaspipette vorsichtig in ein 50ml Zentrifugenröhrchen übertragen werden. Zur Beseitigung eventueller Ficoll-Reste wurde mit NaCl 0,9% gewaschen und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Zellpellet wurde in 5ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren, die zuvor bei der Ficoll-Zentrifugation nicht vollständig von den PBMC abgetrennt worden waren. Zum Stopp der Lysereaktion wurde mit 45ml Nährmedium gewaschen (Zentrifugation für 10min bei 1500rpm, Absaugen des Überstandes) und das entstandene Zellpellet in 5ml Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Aliquots zu je ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen kryokonserviert.

3.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl für die Kryokonservierung wurden 10 μ l der Zellsuspension entnommen, in einem Mikrozentrifugenröhrchen mit 90 μ l Trypanblau vermischt und in einer Zählkammer ausgezählt (siehe Abbildung 3.1).

3 Materialien und Methoden



$$\begin{aligned} \text{Zellzahl} &= \text{ausgezählte Zellen} \\ &\times \text{Kammerfaktor der Zählkammer} \\ &\times \text{Verdünnungsfaktor} \\ &\times \text{Gesamtvolumen der Suspension [ml]} \end{aligned}$$

Abbildung 3.1 Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer
Ein Großquadrat (schraffiert) wird ausgezählt und die Zellzahl dann mit der angegebenen Gleichung hochgerechnet.

3.3.3 Kryokonservierung und Auftauen Zellen

Nach erfolgter Zellzahlbestimmung der frisch isolierten PBMC wurde die Zellsuspension für 5min bei 1500rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in so viel Einfriermedium resuspendiert, dass für die entstandene Suspension eine Zell-Konzentration von $5 \cdot 10^6$ PBMC/ml vorlag. Die entsprechende Formel zur Berechnung der nötigen Menge an Einfriermedium lautete demnach:

$$V_{\text{Medium}} [\text{ml}] = n_{\text{gezählt}}[\text{PBMC}] / 5 \cdot 10^6[\text{PBMC/ml}]$$

Die entstandene Zellsuspension wurde anschließend in 1ml-Kryoröhrchen aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Die Umlagerung in flüssigen Stickstoff erfolgte nach einer Woche.

Zum Auftauen kryokonservierter Zellen aus dem Stickstofftank wurde zuerst ein Zentrifugenröhrchen mit 20ml Nährmedium (Raumtemperatur) befüllt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und sofort im Wasserbad (37°C) aufgewärmt bis makroskopisch keine gefrorenen Partikel mehr sichtbar waren. Der aufgetaute Inhalt wurde zügig in das zuvor vorbereitete Zentrifugenröhrchen überführt und gut mit dem Nährmedium vermischt. Es folgte eine Zentrifugation für 5min bei 1500rpm mit anschließender Resuspension des Zellpellets in 5ml Nährmedium. Dieser Waschvorgang wurde nochmals wiederholt. Die Zellsuspension wurde dann in eine Petrischale überführt und bis zur Weiterverarbeitung am Folgetag im Inkubator (37°C) gelagert.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Allgemeine Erläuterungen und Begriffsklärungen

Die nach dem oben beschriebenen Vorgehen gewonnenen und nach Lagerung in flüssigem Stickstoff wieder aufgetauten und über Nacht bei 37°C gelagerten PBMC wurden anschließend einer von zwei verschiedenen Versuchsreihen zugeführt. Sie wurden entweder hinsichtlich der Expression diverser intrazellulärer und Oberflächenproteinen ohne Beachtung der Zytokinexpression untersucht, oder sie wurden unspezifisch stimuliert und anschließend hinsichtlich der Zytokinproduktion in den verschiedenen Lymphozytenpopulationen untersucht. Im Sinne der besseren Formulierbarkeit und Verständlichkeit wird im Folgenden die zuerst genannte Versuchsreihe als Phänotypisierung und die als Zweites genannte Versuchsreihe als Zytokinbestimmung bezeichnet werden.

Des Weiteren wird im Folgenden unter der Formulierung, es sei mit einem bestimmten Puffer gewaschen worden, immer zu verstehen sein, dass dieser Puffer (z.B. 1ml FACS-Puffer) dem bisherigen Inhalt des Mikrozentrifugenröhrchens zuführt und gut mit diesem durchmischt, anschließend bei 1500rpm für 5min mit Bremse zentrifugiert und der entstandene Überstand abgesaugt wurde.

3.4.2 Präparation für die Bestimmung des Phänotyps ohne Beachtung der Zytokinproduktion (Phänotypisierung)

Für die Präparation zur Phänotypisierung wurden die Zellen aus der Petrischale entnommen und gleichmäßig in die nötigen Mikrozentrifugenröhrchen aufgeteilt. Um auch PBMC abzulösen, die sich eventuell dem Boden der Petrischale angeheftet hatten, wurde hierbei zuerst die Suspension durch mehrfaches Aspirieren und Ablassen der Pipette gut durchmischt, bevor sie in die Mikrozentrifugenröhrchen überführt wurde. Im nächsten Schritt wurde der Inhalt jedes Mikrozentrifugenröhrchens mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und das entstandene Zellpellet in 50µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde je 1µl jedes Farbe-Antikörpers gegen Oberflächenproteine entsprechend des

3 Materialien und Methoden

Färbeschemas zugegeben (siehe Tabelle 3.8), der Ansatz für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und danach mit 1ml PBS gewaschen.

Alle Ansätze, bei denen keine intrazelluläre Färbung durchgeführt wurde, wurden in 350µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen der verbleibenden Ansätze wurden in 250µl Fixationspuffer resuspendiert und für weitere 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Fixierung wurde mit 1ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und es folgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen (4°C, im Dunkeln) in 50µl Permeabilisierungspuffer plus je 1µl der Farbe-Antikörper gegen intrazelluläre Antigene (entsprechend des Färbeschemas; für die FoxP3-Färbung wurden 2µl des Farbe-Antikörpers verwendet). Danach wurde erneut mit 1ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und die Zellen in 350µl FACS-Puffer resuspendiert.

Bis zur Messung wurden alle Ansätze gekühlt gelagert (bei 4°C bzw. auf Eis).

Tabelle 3.8 Färbeschema für die Phänotypisierung

Ansatz	Farbstoff und gekoppelter Antikörper						
	APC	APC-Cy7	PerCP	PE	FITC	Horizon V450	Alexa Fluor 700
1	--	--	--	--	--	--	--
2	CD19	--	CD8	CD4	CD3	--	--
3	CD4	--	CD8	CD62L	CD45RA	CD28	CCR7
4	CD161	--	CD8	CD4	CD45RA	CD28	CCR7
5	CD4	--	CXCR3*	CD8	CD45RA	CD28	CCR7
6	CD4	CCR5	CCR6*	CD8	CD45RA	--	--
7	CD4	--	FoxP3**	CD127	CD25	--	--
8	CD161	--	CCR6*	CD4	CD45RA	CD28	CCR7
9	--	--	--	CD56	CD3	--	--

* Konjugatfarbstoff PerCP-Cy5.5 verwendet

** intrazelluläre Färbung

3.4.3 Präparation für die Bestimmung der Zytokinproduktion diverser Lymphozytenpopulationen (Zytokinbestimmung)

Für die Präparation zur Zytokinbestimmung wurden die am Vortag aufgetauten PBMC in der Petrischale nach Zugabe von PMA (0,3µg/ml), Ionomycin (1µg/ml) und Brefeldin A (10µg/ml) für 4h bei 37°C inkubiert. Die Stimulation durch PMA und Ionomycin regt dabei die Lymphozyten zur unspezifischen Produktion von Zytokinen an, wobei gleichzeitig durch die Zugabe von Brefeldin A deren Sekretion unterbunden wird, was zur intrazellulären Anreicherung der produzierten Zytokine führt. Nach erfolgter Inkubation wurde der Inhalt der Petrischale gleichmäßig auf die nötigen Mikrozentrifugenröhrchen aufgeteilt und zur Beendigung der Stimulation mit 1ml FACS-Puffer gewaschen.

Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte analog zur oben beschriebenen Präparation im Rahmen der Phänotypisierung entsprechend dem Färbeschema für die Zytokinbestimmung (siehe Tabelle 3.9). Als Besonderheit wurde das Oberflächenprotein CD45RO jedoch erst nach der Inkubation mit Fixierungspuffer und vor der Permeabilisierung der Zellen gefärbt, da in Vorexperimenten ein Absinken der Signalintensität der Färbung aufgefallen war, wenn die Zellen erst nach erfolgter Färbung fixiert wurden. Dieser zusätzliche Färbeschritt bestand aus einem Waschvorgang mit 1ml FACS-Puffer, gefolgt von der 30-minütigen Inkubation in 50µl FACS-Puffer plus 1µl anti-CD45RO-Antikörper bei 4°C im Dunkeln und einem weiteren Waschen mit 1ml FACS-Puffer.

3 Materialien und Methoden

Tabelle 3.9 Färbeschema für die Zytokinbestimmung

Ansatz	Farbstoff und gekoppelter Antikörper					
	APC	PerCP	PE	FITC	Horizon V450	Alexa Fluor 700
10	IK**	--	IK**	IK**	--	--
11	CD4	CD8	CD45RO	IFN γ **	CD28	CCR7
12	CD4	CD8	CD45RO	TNF α **	CD28	CCR7
13	IL-4**	CD8	CD4	CD45RA	CD28	CCR7
14	IL-10**	CD8	CD4	CD45RA	CD28	CCR7
15	ROR γ t**	CCR6*	CD4	CD45RA	CD28	IL17

IK = Isotypkontrolle

* Konjugatfarbstoff PerCP-Cy5.5 verwendet

** intrazelluläre Färbung

3.5 Messung und Datenanalyse

3.5.1 Messung mittels Durchflusszytometrie

Die mit Antikörpern markierten Zellen wurden noch am selben Tag am Durchflusszytometer gemessen. Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren dar, bei dem Zellen einzeln in einen laminaren Fluss geschleust werden und dort mittels verschiedener Laser und entsprechender Photodetektoren hinsichtlich ihrer optische Eigenschaften charakterisiert werden. Dabei wird zum einen die durch die physikalischen Eigenschaften der Zelle bedingte Lichtbrechung bestimmt, zum anderen wird die Fluoreszenz gemessen, welche von den zuvor an die Zellen gekoppelten, mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochromen) markierten Antikörper bedingt wird.

Die Lichtbrechungseigenschaften der Zellen werden beeinflusst durch die Größe der Zelle, die Beschaffenheit ihrer Membran, den Refraktionsindex und den intrazellulären Bestandteilen. Zur Beurteilung der einzelnen Zellen werden sie mit einem Laser bestrahlt und anschließend das Signal mittels zweier verschiedener Photodetektoren aufgefangen. Einer dieser Detektoren fängt nur seitlich abgelenktes Licht auf. Dies wird als Seitwärtsstreuung (engl.: *sideward scatter*, SSC) bezeichnet und dient in erster Linie dazu, Granulozyten von Lymphozyten zu unterscheiden. Granulozyten erzeugen aufgrund ihrer Granula

3 Materialien und Methoden

vermehrt Streulicht als Lymphozyten, was zu einer höheren Signalstärke im SSC-Messkanal führt. Der zweite Photodetektor misst Licht, welches in Richtung des Zellflusses abgelenkt wurde, also nach „vorne“, weswegen das Signal als Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) bezeichnet wird. Das Ausmaß dieser Ablenkung ist proportional zur Zelloberfläche, weswegen Lymphozyten im Vergleich zu den wesentlich größeren Monozyten ein geringeres FSC-Signal erzeugen.

Zur Messung der Fluoreszenz werden die Zellen mit weiteren Lasern bestrahlt, welche die an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome erregen. Dabei können die verschiedenen Fluorochrome trotz Erregung durch denselben Laser Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren, was dann in jeweils geeigneten Photodetektoren aufgefangen wird. Die Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorochrome sind Tabelle 3.10 zu entnehmen. Bei den sogenannten Tandem-Fluorochromen PerCP-Cy5.5 und APC-Cy7 handelt es sich dabei um eine Kopplung der Basisfluorochrome PerCP bzw. APC an die Cyanine Cy5.5 bzw. Cy7. Auf diese Cyanine wird die vom Basisfluorochrom aufgenommene Energie übertragen und dann erst emittiert, wodurch sich die Emissionswellenlänge ändert.

3 Materialien und Methoden

Tabelle 3.10 Eigenschaften der verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Ex _{max} [*]	Em _{max} ^{**}	Exzitationslaser
Allophycocyanin (APC)	650nm	660nm	633nm (rot)
Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplex (PerCP)	490nm	677nm	488nm (blau)
Phycoerythrin (PE)	496nm oder 546nm	578nm	488nm (blau)
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	494nm	519nm	488nm (blau)
BD Horizon™ V450	404nm	448nm	405nm (violett)
Alexa Fluor® 700	696nm	719nm	633nm (rot)
PerCP-Cy5.5	490nm	695nm	488nm (blau)
APC-Cy7	650nm	785nm	633nm (rot)

* Wellenlänge des Lichtes mit maximalem Exzitationseffekt

** Wellenlänge auf der die maximale Intensität des emittierten Lichtes liegt

Bei der Messung einer Kombination mehrerer Fluorochrom-Signale im selben Testansatz ist es stets nötig, die für diese Kombination typische gegenseitige Überlagerung der Signale (d.h. das Signal von Farbstoff A wird fälschlicherweise auch zum Teil im Detektor für Farbstoff B gemessen) zu beachten. Hierzu wird mithilfe der Kompensationseinstellungen des FACS-Gerätes der falsch detektierte Signalanteil herausgerechnet.

3.5.2 Auswertung der Messdaten

Die graphische Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland, Version 6.1.3) bzw. FlowJo (FlowJo LLC; Ashland, Oregon, USA; Version 10.0.7.2). Die vom Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensitäten können auf

3 Materialien und Methoden

verschiedene Weisen graphisch dargestellt werden (z.B. Histogramm, Density-Plot, Dot-Plot). Um die Fragestellung dieser Arbeit bearbeiten zu können, wurde die Darstellung mit Dot-Plots gewählt, in denen man jeweils zwei Signale (FSC, SSC oder Fluoreszenz-Signale) gegeneinander auftragen kann. Da jede Zelle eine geringe Autofluoreszenz besitzt und es somit praktisch unmöglich ist, bei einem gemessenen Event (d.h. einer Zelle) keine Fluoreszenz festzustellen, muss für jedes Fluoreszenzsignal ein Grenzwert („Cutoff“) festgelegt werden, der angibt, ab welcher Fluoreszenzintensität das Event als positiv erachtet wird. Alternativ können im Dot-Plot erkennbare Gruppierungen von Events („Populationen“) markiert werden (Festlegung von „Gates“, kurz „Gating“). Die Festlegung des Cutoffs bzw. der Gates erfolgte dabei anhand der meist gut erkennbaren graphischen Darstellung der gefärbten Populationen unter gleichzeitigem Abgleichen mit der Negativkontrolle (ungefärbte Zellen in Ansatz 1). Repräsentative Graphiken werden jeweils in Kapitel 4 gezeigt.

3.5.3 Statistische Analyse

Für die übersichtliche Darstellung der Daten und Berechnung der prozentualen Anteile der jeweils für einen Marker positiven Zellen im entsprechenden Gate wurde Microsoft Excel (Microsoft Corporation; Redmond, USA; Office-Versionen 2010 und 2013) verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (IBM Software; Armonk, New York, USA; Version 22). Vergleiche der drei Studiengruppen erfolgten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, wobei die Nullhypothese eine Gleichheit der Gruppen postulierte. Für alle im Kruskal-Wallis-Test als signifikant erachteten Unterschiede wurden entsprechende Post-Hoc-Tests für paarweise Vergleiche der Studiengruppen durchgeführt, wobei wiederum $p < 0,05$ als signifikant galt. P-Werte zwischen 0,15 und 0,05 wurde als statistischer Trend gewertet. Für multiples Testen wurde nicht korrigiert, da die Gefahr einer inadäquaten Überkorrektur bei nicht ausreichend abschätzbarer Abhängigkeit der Vergleiche untereinander bestand.

Die in Kapitel 4 dargestellten Tabellen zeigen in der letzten Spalte jeweils Signifikanzen bzw. Trends für die einzelnen Tests an. In Klammer stehende Werte geben statistische Trends an. Die Abkürzung KWT zeigt ein Signifikanz-

3 Materialien und Methoden

bzw. Trendniveaus des Kruskal-Wallis-Tests an, falls keiner der Post-Hoc-Tests Trend- oder Signifikanzniveau erreichte.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Daten der Patientengruppen

Zu Beginn wurden Alters- und Geschlechterverteilung der Patientengruppen beurteilt. Dabei musste zwischen der Messreihe zur Phänotypisierung und der Messreihe zur Zytokinbestimmung unterschieden werden, da nicht alle Proben genug Material für beide Messreihen beinhalteten.

Bei der Phänotypisierung unterschieden sich die Alter von T1DM RO, T1DM LS und Kontrollgruppe (KG) nicht signifikant voneinander (T1DM RO: $9,4 \pm 3,2$ Jahre; T1DM LS: $10,5 \pm 4,8$ Jahre; KG: $10,1 \pm 4,4$ Jahre; $p = 0,88$). Da für 21 Proben der Kontrollgruppe nicht alle Versuchsansätze durchgeführt worden waren, wurde der Altersvergleich auch unter Ausschluss dieser Patienten durchgeführt, was wiederum keinen signifikanten Unterschied ergab. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Altersunterschiede bei der Zytokinbestimmung. Die Geschlechterverteilung unterschied sich innerhalb der Gruppen, wobei vor allem T1DM RO einen höheren weiblichen Anteil hatte, als die anderen Gruppen. Tabelle 4.1 gibt einen zusammenfassenden Überblick.

Tabelle 4.1 Alters- und Geschlechterverteilung der Probanden

		T1DM RO	T1DM LS	KG	p
Phäno- typisierung	Alter	9,4 [3,2]	10,5 [4,8]	10,1 [4,4]	0,88
	männlich	4	12	28	--
	weiblich	7	7	20	--
	Krankheitsdauer	--	4,4 [3,5]	--	--
Zytokin- bestimmung	Alter	9,4 [3,2]	10,3 [4,9]	10,3 [4,4]	0,89
	männlich	4	12	30	--
	weiblich	7	6	18	--
	Krankheitsdauer	--	4,4 [3,6]	--	--

Alle Zeitangaben als MW [SD] (in Jahren). Einzelne Versuchsansätze konnten wegen unzureichenden Materials nicht für alle Probanden der Kontrollgruppe angesetzt werden. Dies betraf bei Phänotypisierung und Zytokinbestimmung jeweils 11 männliche und 10 weibliche Patienten, weswegen das mittlere Alter hier bei $11,2 \pm 4,7$ Jahren (Phänotypisierung) bzw. $11,5 \pm 4,6$ Jahren (Zytokinbestimmung) lag. Mit einem p-Wert von dann 0,56 bzw. 0,41 gab es weiterhin keinen signifikanten Altersunterschied zwischen den Gruppen.

4.2 Verteilung von B-Zellen, Natürlichen Killerzellen und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Bevor die einzelnen T-Zell-Populationen genauer unterteilt und beurteilt wurden, erfolgte eine allgemeine Betrachtung der prozentualen Verteilung der großen Lymphozytenpopulationen. Hierfür wurden die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8 und CD56 gefärbt, anhand derer innerhalb des Lymphozyten-Gates B-Zellen (CD3⁻CD19⁺), T-Zellen (CD3⁺), CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺CD8⁺), NK-Zellen (CD3⁻CD56⁺) und NKT-Zellen (CD3⁺CD56⁺) charakterisiert wurden. Abbildung 4.1 zeigt die dabei angewandte Gating-Strategie. Es sei hier angemerkt, dass sowohl in diesem, als auch in allen folgenden Kapiteln stets ausschließlich Zellen betrachtet werden, welche

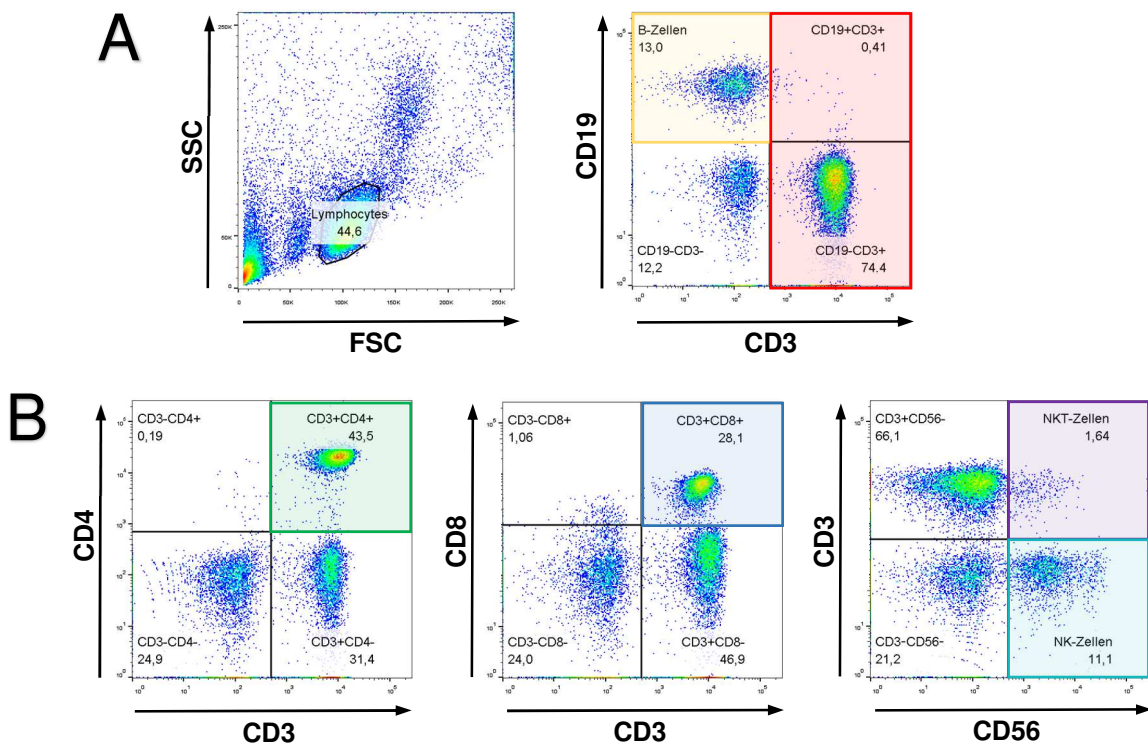


Abbildung 4.1 Gating von Lymphozyten sowie B-, T-, NK- und NKT-Zellen

Lymphozyten wurden anhand von FSC und SSC gated und anschließend in B-Zellen (gelb) und T-Zellen (rot) unterteilt (A). Die Charakterisierung der Gesamtzahl an CD4⁺ Zellen (grün) und CD8⁺ Zellen (blau) sowie der NK- und NKT-Zellen (türkis und violett) erfolgte unter Einbeziehung der CD3-Färbung (B) (eigene Abbildung).

SSC = sideward scatter ; FSC = forward scatter

4 Ergebnisse

innerhalb des anhand von SSC und FSC festgelegten Lymphozyten-Gates liegen.

Der Anteil der B-Zellen an der Lymphozytenpopulation war in allen Studiengruppe vergleichbar hoch ($p > 0,15$) und auch für den Anteil der T-Zellen an der Lymphozytenpopulation konnte nur ein statistischer Trend zur Erhöhung insbesondere bei T1DM RO im Vergleich zu den anderen Studiengruppen festgestellt werden. Ebenso konnten keine Unterschiede zwischen den Studiengruppen in Bezug auf die Expression von CD4 und CD8 festgestellt werden (p -Werte $> 0,05$), wenngleich der Kruskal-Wallis-Test beim Vergleich der CD8⁺ Zellen innerhalb des CD3⁺ Gates einen statistischen Trend aufwies, der am ehesten auf erhöhte Werte bei T1DM LS im Vergleich zu den anderen Studiengruppen zurückzuführen ist. Der durchschnittliche Anteil von CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Zellen an der CD3⁺ Population lag in allen Studiengruppen unter 0,5% und wurde somit als vernachlässigbar erachtet.

Bei der Betrachtung von CD56 fiel bei T1DM RO ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringerer Anteil von NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation auf. Der Anteil von NKT-Zellen an den Lymphozyten hingegen war bei T1DM LS im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell niedriger, wobei dies erst bei dem Vergleich des NKT-Zell-Anteils innerhalb der CD3⁺ Population Signifikanzniveau erreichte. Abbildung 4.2 und Tabelle 4.2 geben einen Überblick über die beschriebenen Daten.

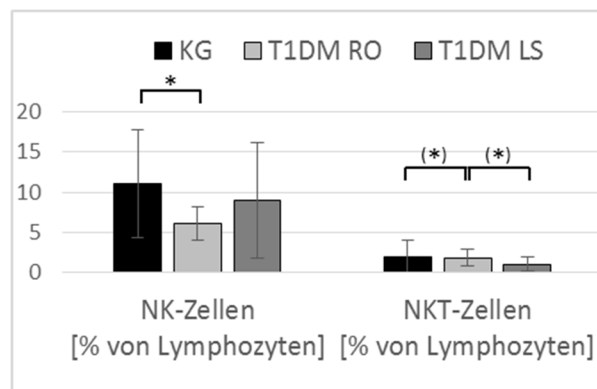


Abbildung 4.2

NK- und NKT-Zellen in den Studiengruppen

T1DM RO weisen deutlich geringere Prozente an NK-Zellen auf, was sich jedoch bei T1DM LS niedriger darstellt. Der prozentuelle Anteil der NKT-Zellen zeigt sich im Krankheitsverlauf genau entgegengesetzt.

(*) $0,05 \leq p < 0,15$; * $p < 0,05$; (Post-Hoc-Tests des KWT)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.2 Verteilung von B-, T- und NK-Zell-Markern

Marker (Gate)	T1DM		KG (n = 48)	Signifikanzen
	RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CD3⁺ (LZ)	76,72 [4,93]	72,37 [10,97]	70,10 [10,22]	p _{KWT} = 0,131
CD3⁻CD19⁺ (LZ)	15,74 [4,82]	17,19 [7,48]	16,84 [5,87]	p _{KWT} = 0,952
CD4⁺ (CD3⁺)	59,51 [4,53]	58,29 [6,68]	57,40 [9,73]	p _{KWT} = 0,715
CD8⁺ (CD3⁺)	32,38 [5,14]	35,75 [5,98]	32,48 [7,50]	p _{KWT} = 0,149
CD4⁺CD8⁺ (CD3⁺)	0,38 [0,19]	0,40 [0,21]	0,35 [0,27]	p _{KWT} = 0,183
CD4/CD8-Quotient	1,90 [0,45]	1,70 [0,49]	1,93 [0,78]	p _{KWT} = 0,493
CD3⁻CD56⁺ (LZ)	6,08 [2,07]	8,93 [7,19]	11,02 [6,67]	p _{KWT} = 0,029 p _{RO-KG} = 0,036 p _{LS-KG} = 0,451 p _{LS-RO} = 0,732
CD3⁺CD56⁺ (LZ)	1,82 [1,03]	1,06 [0,87]	2,01 [1,97]	p _{KWT} = 0,034 p _{RO-KG} = 1,000 p _{LS-KG} = 0,058 p _{LS-RO} = 0,086
CD56⁺ (CD3⁺)	2,40 [1,35]	1,51 [1,22]	2,94 [2,67]	p _{KWT} = 0,023 p _{RO-KG} = 1,000 p _{LS-KG} = 0,023 p _{LS-RO} = 0,163

Angaben als MW [SD] (als % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). LZ = Lymphozyten; Daten aus Ansatz 2 und 9 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41) Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn p_{KWT} < 0,05. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

Aufgrund der Limitierung der Anzahl möglicher Färbungen im selben Versuchsansatz wurde in der Regel auf die Färbung von CD3 verzichtet und T-Zellen anhand von CD4 und CD8 charakterisiert. Dabei wurden regelhaft nur CD8-hochpositive Zellen als CD8⁺ getaget, um die in Abbildung 4.1 (Seite 49) sichtbaren CD8-niedrigpositiven CD3⁻ Zellen auszuschließen. Für CD4⁺ Zellen entfiel diese Angleichung, da kaum CD3⁻CD4⁺ Zellen vorlagen.

4.3 Naive, Gedächtnis- und Effektor-Zellen

Um genauer unterscheiden zu können, auf welcher Stufe der Differenzierung von der naiven zur ausdifferenzierten Effektorzelle sich die jeweils untersuchten Zellen befinden, wurden in den meisten Versuchsansätzen die Markerproteine CD28, CCR7 und CD45RA bzw. CD45RO gefärbt. Wie in Kapitel 1.1.2.1 beschrieben, ist die Expression von CD45RA bzw. die fehlende Expression von CD45RO typisch für naive Zellen (T_N) oder für terminal ausdifferenzierte Zellen (T_{EMRA}). Außerdem exprimieren T_N und zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) CCR7 und CD28, während Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) und T_{EMRA} diese Marker nicht exprimieren (mit Ausnahme von $CD4^+$ T_{EM} , welche CD28 ebenfalls exprimieren). Allerdings gibt es hierbei auch Zwischenstufen, welche einen dieser Marker (CCR7 oder CD28) exprimieren, jedoch nicht den zweiten. In der hier vorliegenden Studie wurde CCR7 als präziserer Marker angesehen als CD28, da CD28 während der Differenzierung von $CD8^+$ Zellen in verschiedenen Intensitätsniveaus exprimiert wird und bei $CD4^+$ Zellen erst in späten Differenzierungsstadien herunterreguliert wird, während CCR7 entweder hoch- oder niedrig -/gar nicht exprimiert wird und somit die Unterteilung in eine positive und negative Population besser möglich ist.³² Zudem wurde in vielen vorhergehenden Studien CCR7 und nicht CD28 als Marker für die Charakterisierung der verschiedenen Differenzierungsstufen angewandt, was nochmals für die vorrangige Orientierung an CCR7 spricht.^{23,119-121}

Einen Überblick über das Vorgehen beim Gating dieser Markerproteine gibt Abbildung 4.3. Wie dort gezeigt, wurden in unserer Studie nur Zellen als $CD45RA^+$ angesehen, welche diesen Marker sehr hoch exprimierten, um Zellen auszuschließen, welche sich in Übergangsstadien der Differenzierung von $CD45RA^+CD45RO^-$ zu $CD45RA^-CD45RO^+$ befanden und somit beide Marker in geringem Maße exprimierten. Entsprechend wurden in der Zytokinbestimmung alle $CD45RO^-$ -exprimierenden Zellen als $CD45RO^+$ gegatet – also auch die doppelt-positiven Zellen.

Zur Beurteilung der Expression von CD28, CCR7 und CD45RA wurden die prozentualen Anteile von $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Zellen, welche die jeweiligen Marker bzw. Marker-Kombinationen exprimieren, in Versuchsansatz 5 der

4 Ergebnisse

Phänotypisierung bestimmt. Bezüglich der Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD4⁺ Zellen ergaben sich beim Vergleich der Studiengruppen keine relevanten Unterschiede (siehe Tabelle 4.3). Es wurde eine leichte Verschiebung hin zu mehr CD28⁻ Zellen beobachtet werden. Da es sich dabei jedoch lediglich um eine Verschiebung in Größenordnungen von rund 1% der CD4⁺ Zellen handelte, ist sie in Anbetracht der Ungenauigkeit der Messmethode zurückhaltend zu bewerten.

4 Ergebnisse

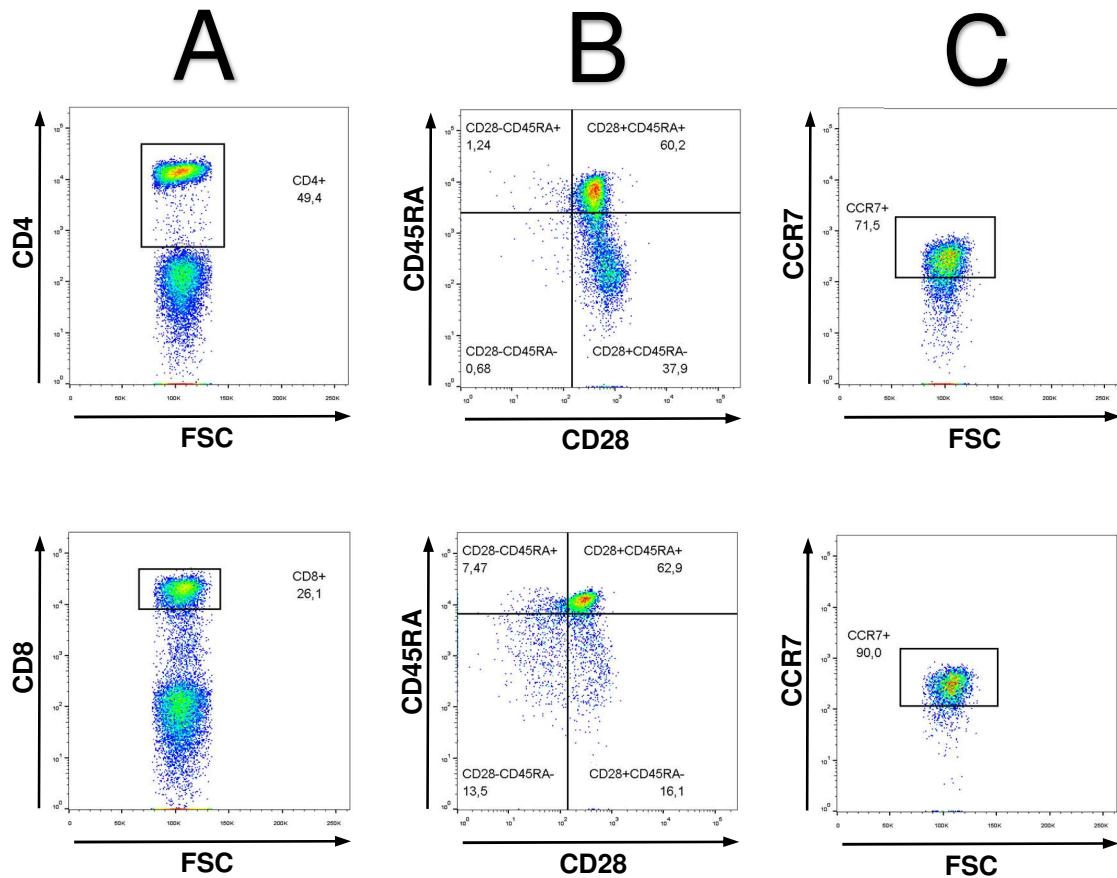


Abbildung 4.3

Grundlegende Gating-Strategie

Schwarzen Kästchen bzw. Quadranten geben das festgelegte Gate an (Zahlen entsprechen dem Prozentsatz der jeweils im Gate befindlichen Events).

Innerhalb der Lymphozyten-Population wurden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen gegatet, wobei nur CD8-hochpositive Zellen als CD8⁺ erachtet wurde (siehe 4.2) (A). Innerhalb dieser Populationen wurden CD45RA und CD28 wie in (B) abgebildet gegatet, wobei die Cutoffs für CD45RA aufgrund des unterschiedlichen Färbeverhaltens der beiden Populationen auch jeweils individuell angepasst werden mussten, was optisch stets gut möglich war. Zuletzt erfolgte das Gating von CCR7 (C). Da in der Regel nur eine (positive) Population sichtbar war, wurde der Cutoff hierbei an der Nullkontrolle orientiert und nur in Einzelfällen – bei sehr intensiver Färbung – angepasst.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3 Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD4⁺ Lymphozyten

Population (im CD4 ⁺ Gate)	T1DM		KG (n = 47)	Signifikanzen
	RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CD45RA ⁺	62,94 [5,64]	60,40 [12,36]	63,90 [12,06]	p _{KWT} = 0,566
CCR7 ⁺	69,42 [8,16]	72,35 [11,65]	70,54 [12,51]	p _{KWT} = 0,757
CD28 ⁺	97,65 [2,58]	98,01 [2,11]	96,90 [3,26]	p _{KWT} = 0,048 p _{RO-KG} = 0,814 p _{LS-RO} = 1,000 p _{LS-KG} = 0,048
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	48,84 [8,93]	50,89 [13,29]	51,83 [12,79]	p _{KWT} = 0,777
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	20,58 [3,81]	21,46 [6,96]	18,70 [6,22]	p _{KWT} = 0,272
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	16,47 [3,50]	18,14 [7,88]	17,40 [8,57]	p _{KWT} = 0,969
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	14,10 [5,25]	9,51 [6,46]	12,06 [7,89]	p _{KWT} = 0,181
CD45RA ⁺ CD28 ⁺	61,40 [5,84]	59,13 [12,79]	62,02 [12,49]	p _{KWT} = 0,668
CD45RA ⁻ CD28 ⁺	36,26 [5,55]	38,88 [11,86]	34,88 [11,41]	p _{KWT} = 0,394
CD45RA ⁻ CD28 ⁻	0,80 [0,64]	0,72 [1,00]	1,22 [1,46]	p _{KWT} = 0,033 p _{RO-KG} = 1,000 p _{LS-KG} = 0,027 p _{LS-RO} = 0,535
CD45RA ⁺ CD28 ⁻	1,55 [2,00]	1,27 [1,20]	1,88 [2,26]	p _{KWT} = 0,075
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	48,04 [8,83]	50,19 [13,58]	50,91 [13,14]	p _{KWT} = 0,724
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁻	0,80 [1,38]	0,70 [0,68]	0,92 [1,37]	p _{KWT} = 0,139
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	20,31 [3,85]	21,17 [6,83]	18,32 [6,11]	p _{KWT} = 0,199
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁻	0,28 [0,33]	0,29 [0,49]	0,38 [0,43]	p _{KWT} = 0,124
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	15,95 [3,32]	17,71 [7,52]	16,55 [8,05]	p _{KWT} = 0,897
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	0,52 [0,34]	0,43 [0,55]	0,85 [1,11]	p _{KWT} = 0,028 p _{RO-KG} = 0,028 p _{LS-KG} = 0,025 p _{LS-RO} = 0,254
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	13,36 [5,16]	8,94 [6,14]	11,11 [7,51]	p _{KWT} = 0,168
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	0,75 [0,64]	0,57 [0,56]	0,96 [1,05]	p _{KWT} = 0,122

Alle Angaben als MW [SD] (in % von CD4⁺). Daten aus Ansatz 5 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn p_{KWT} < 0,05. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

4 Ergebnisse

Für CD8⁺ Zellen wies die T1DM LS-Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe ein vermehrtes Vorkommen von CCR7⁺ Zellen auf, was sich graphisch auch bei der T1DM RO-Gruppe abzeichnete ((siehe Tabelle 4.4 und Abbildung 4.4). Bei genauerer Unterteilung der CD8⁺ Population fiel auf, dass sowohl in der T1DM RO-Gruppe als auch in der T1DM LS-Gruppe vor allem die CD45RA⁺CCR7⁻ Population vermindert war. Dies erreichte in der T1DM LS-Gruppe Signifikanzniveau, während es bei der T1DM RO-Gruppe speziell beim Vergleich der CD45RA⁺CCR7⁻CD28⁻ Zellen signifikant war. Die Verschiebung der Verhältnisse der Populationen zeigte sich dabei für T1DM LS signifikant in Richtung der CD45RA⁺CCR7⁺ Population, was wiederum graphisch auch für T1DM RO galt, wenngleich nicht statistisch signifikant. Sowohl die CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁺ als auch die CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁻ Population war bei T1DM RO und T1DM LS im Schnitt stärker vertreten als in der Kontrollgruppe, was statistisches Trendniveau, jedoch kein Signifikanzniveau erreichte. Die T1DM RO-Gruppe hat außerdem durchschnittlich geringfügig mehr CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁻ Zellen als die Kontrollgruppe.

Während die CD28-Expression auf CD8⁺ Zellen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen zeigte, fiel für CD45RA wiederum eine leichte Tendenz zur Überexpression bei T1DM auf, diesmal jedoch nur für T1DM LS.

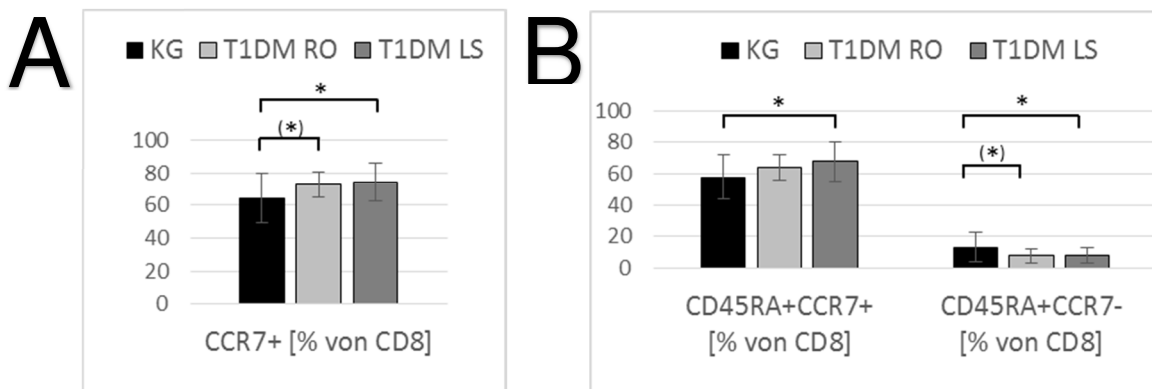


Abbildung 4.4

Erhöhte Expression von CCR7 bei T1DM

Die vermehrte CCR7-Expression bei T1DM (A) spiegelt sich vor allem in der proportionalen Zunahme der naiven Population und Abnahme der T_{EMRA} wieder (B).

(*) $0,05 \leq p < 0,15$; * $p < 0,05$ (Post-Hoc-Tests des KWT)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.4 Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD8⁺ Lymphozyten (Teil 1)

Population (im CD8 ⁺ Gate)	T1DM		KG (n = 47)	Signifikanzen
	RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CD45RA⁺	71,98 [5,57]	76,23 [11,47]	71,03 [10,70]	p _{KWT} = 0,070
CCR7⁺	73,03 [7,78]	74,47 [11,82]	64,45 [15,18]	p _{KWT} = 0,008 p _{RO-KG} = 0,280 p _{LS-KG} = 0,010 p _{LS-RO} = 1,000
CD28⁺	79,81 [7,27]	78,52 [13,98]	74,74 [14,15]	p _{KWT} = 0,345
CD45RA⁺CCR7⁺	64,15 [7,81]	68,01 [12,53]	57,76 [14,24]	p _{KWT} = 0,005 p _{RO-KG} = 0,748 p _{LS-KG} = 0,004 p _{LS-RO} = 0,579
CD45RA⁻CCR7⁺	8,88 [2,18]	6,47 [2,35]	6,69 [2,42]	p _{KWT} = 0,023 p _{RO-KG} = 0,027 p _{LS-KG} = 1,000 p _{LS-RO} = 0,043
CD45RA⁻CCR7⁻	19,14 [5,07]	17,31 [10,17]	22,28 [10,67]	p _{KWT} = 0,096
CD45RA⁺CCR7⁻	7,83 [4,67]	8,22 [4,90]	13,27 [9,21]	p _{KWT} = 0,010 p _{RO-KG} = 0,079 p _{LS-KG} = 0,033 p _{LS-RO} = 1,000
CD45RA⁺CD28⁺	63,83 [7,83]	64,69 [15,05]	58,68 [15,11]	p _{KWT} = 0,156
CD45RA⁻CD28⁺	15,98 [2,76]	13,83 [5,41]	16,06 [5,89]	p _{KWT} = 0,357
CD45RA⁻CD28⁻	12,03 [4,93]	9,94 [8,30]	12,91 [7,99]	p _{KWT} = 0,054
CD45RA⁺CD28⁻	8,15 [5,34]	11,54 [8,25]	12,35 [8,93]	p _{KWT} = 0,176

Alle Angaben als MW [SD] (in % von CD8⁺). Daten aus Ansatz 5 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn p_{KWT} < 0,05. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

Tabelle aus Gründen der Übersichtlichkeit in 2 Teile geteilt (siehe auch Tabelle 4.5).

4 Ergebnisse

Tabelle 4.5 Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD8⁺ Lymphozyten (Teil 2)

Population (im CD8 ⁺ Gate)	T1DM		KG (n = 47)	Signifikanzen
	RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	59,12 [9,09]	60,86 [15,42]	53,83 [15,60]	p _{KWT} = 0,093
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁻	5,03 [4,71]	7,14 [6,44]	3,93 [3,89]	p _{KWT} = 0,085
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	6,85 [1,94]	5,07 [2,04]	5,37 [2,03]	p _{KWT} = 0,079
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁻	2,03 [0,74]	1,40 [1,06]	1,33 [0,91]	p _{KWT} = 0,020 p _{RO-KG} = 0,021 p _{LS-KG} = 1,000 p _{LS-RO} = 0,042
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	9,14 [2,48]	8,76 [4,17]	10,70 [5,67]	p _{KWT} = 0,499
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	10,00 [4,83]	8,54 [7,37]	11,58 [7,58]	p _{KWT} = 0,060
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	4,71 [3,99]	3,82 [2,69]	4,85 [4,12]	p _{KWT} = 0,836
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	3,12 [1,15]	4,40 [2,97]	8,42 [7,86]	p _{KWT} = 0,004 p _{RO-KG} = 0,011 p _{LS-KG} = 0,059 p _{LS-RO} = 1,000

Alle Angaben als MW [SD] (in % von CD8⁺). Daten aus Ansatz 5 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn p_{KWT} < 0,05. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

Tabelle aus Gründen der Übersichtlichkeit in 2 Teile geteilt (siehe auch Tabelle 4.4).

Es konnte also zusammenfassend festgehalten werden, dass T1DM Patienten auf CD8⁺ Zellen vermehrt CCR7 exprimieren, wobei diese Veränderung in erster Linie CD8⁺CD45RA⁺ Zellen betraf und auf Kosten der CD45RA⁺CCR7⁻ Population zugunsten der CD45RA⁺CCR7⁺ Population ging. Gleichzeitig gab es Hinweise auf eine mögliche leichte Erhöhung der CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁻ Population bei T1DM RO. Die Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD4⁺ Zellen war bei T1DM im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht maßgeblich verändert.

Bei der Betrachtung der Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Kombinationen aus CD45RA, CCR7 und CD28 fiel wie zu erwarten auf, dass manche Kombinationen nur sehr selten auftraten. In den folgenden Untersuchungen wurden nur Populationen betrachtet, die mehr als 2% des

4 Ergebnisse

CD4⁺ bzw. des CD8⁺ Gates ausmachten. Die Charakterisierung kleinerer Zellpopulationen wurde als nicht ausreichend robust gegenüber zufälligen Datenstreuungen angesehen.

4.4 Expression von Chemokinrezeptoren

Um Hinweise über das Migrationsverhalten von T-Zellen bei T1DM zu erhalten, wurde die Expression der proinflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 untersucht. Um die Expression des für Th17-Zellen typischen Chemokinrezeptors CCR6 genauer zu charakterisieren, wurde zusätzlich das Muster der Kombination von CCR6 und CCR5, bzw. von CCR6 und CD161 untersucht.

4.4.1 Expression von CXCR3 auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten

Abbildung 4.5 zeigt das Gating der CXCR3⁺ Zellpopulation. Eine auffällige Mehrexpression von CXCR3 wurde auf CD8⁺ Lymphozyten von T1DM im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (siehe Tabelle 4.6).

4 Ergebnisse

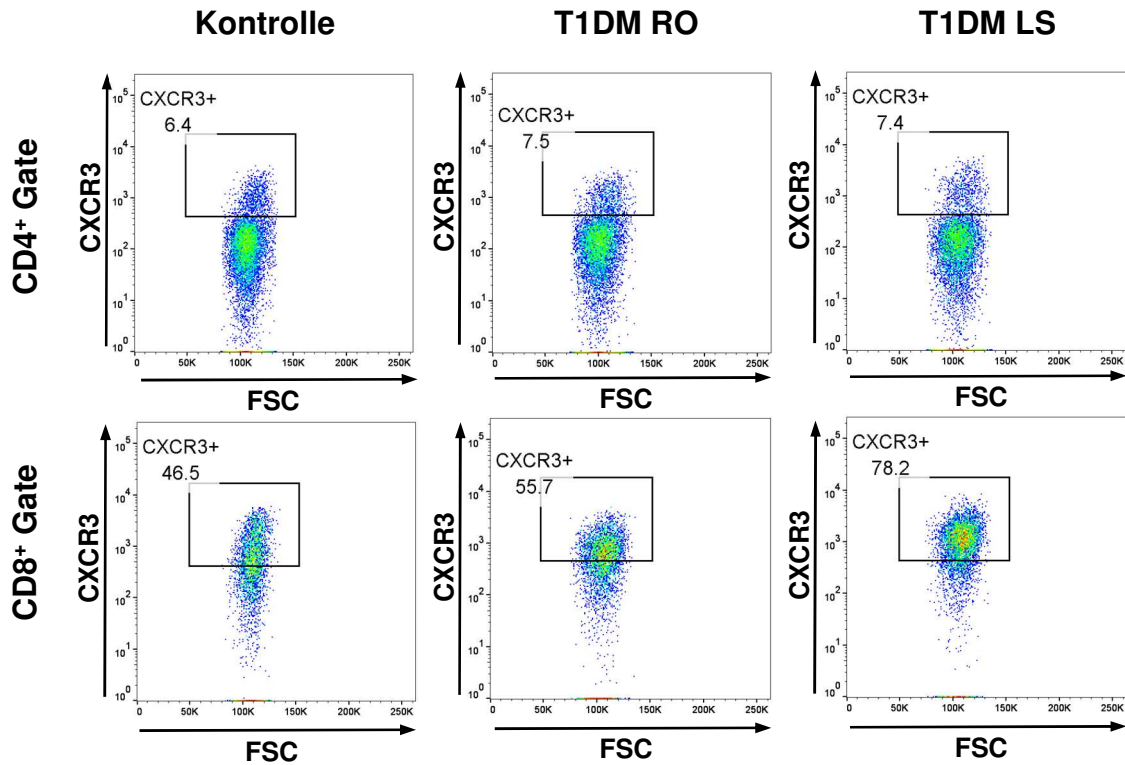


Abbildung 4.5 Gating der CXCR3⁺ Population

Die gegateten Events befinden sich innerhalb des schwarzen Kästchens (Zahlen geben den Prozentsatz im Gate befindlicher Zellen an) Während sich für CD4⁺ Zellen eine deutliche positive Population darstellte, musste bei CD8⁺ Zellen der Cutoff an der Nullkontrolle orientiert werden, da der Übergang von Negativ- zu Positivpopulation fließend war.

Innerhalb der CD8⁺ Lymphozytenpopulation waren es vor allem CCR7⁺ Zellen, welche erhöhte CXCR3-Expression aufwiesen. Im Vergleich der weiteren CD8⁺ Subpopulationen wiesen alle untersuchten CCR7⁺ Populationen – also CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁺, CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁻ und CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺ Zellen – signifikant erhöhte CXCR3-Expression bei T1DM LS im Vergleich mit der Kontrollgruppe auf. Gleiches galt auch für den Vergleich von T1DM RO mit der Kontrollgruppe mit Ausnahme der CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺ Zellen, deren durchschnittliche CXCR3-Expression bei T1DM RO zwar auch höher lag, als bei der Kontrollgruppe, dies jedoch statistisch keine Signifikanz und auch keinen statistischen Trend ergab. Die CXCR3-Expression auf CD8⁺CCR7⁻ Zellen war im Gegensatz zu den CD8⁺CCR7⁺ im Vergleich der Studiengruppen nicht signifikant verändert. Lediglich für die

4 Ergebnisse

CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁻CD28⁺ Lymphozytenpopulation ergab der Kruskal-Wallis-Test einen statistischen Trend. Die durchschnittliche CXCR3-Expression war auch hier wiederum bei T1DM höher als bei Kontrollen. Abbildung 4.6 veranschaulicht die beschriebenen Expressionsunterschiede.

Auf CD4⁺ Lymphozyten wurde vor allem auf CD45RA⁻CD28⁺ Zellen eine Expression von CXCR3 gemessen, wohingegen nur sehr wenige Events der CD45RA⁺CD28⁺ Zellpopulation positiv für CXCR3 waren. Signifikante Unterschiede der Studiengruppen hinsichtlich der CXCR3-Expression auf CD4⁺ Lymphozyten konnten nicht festgestellt werden.

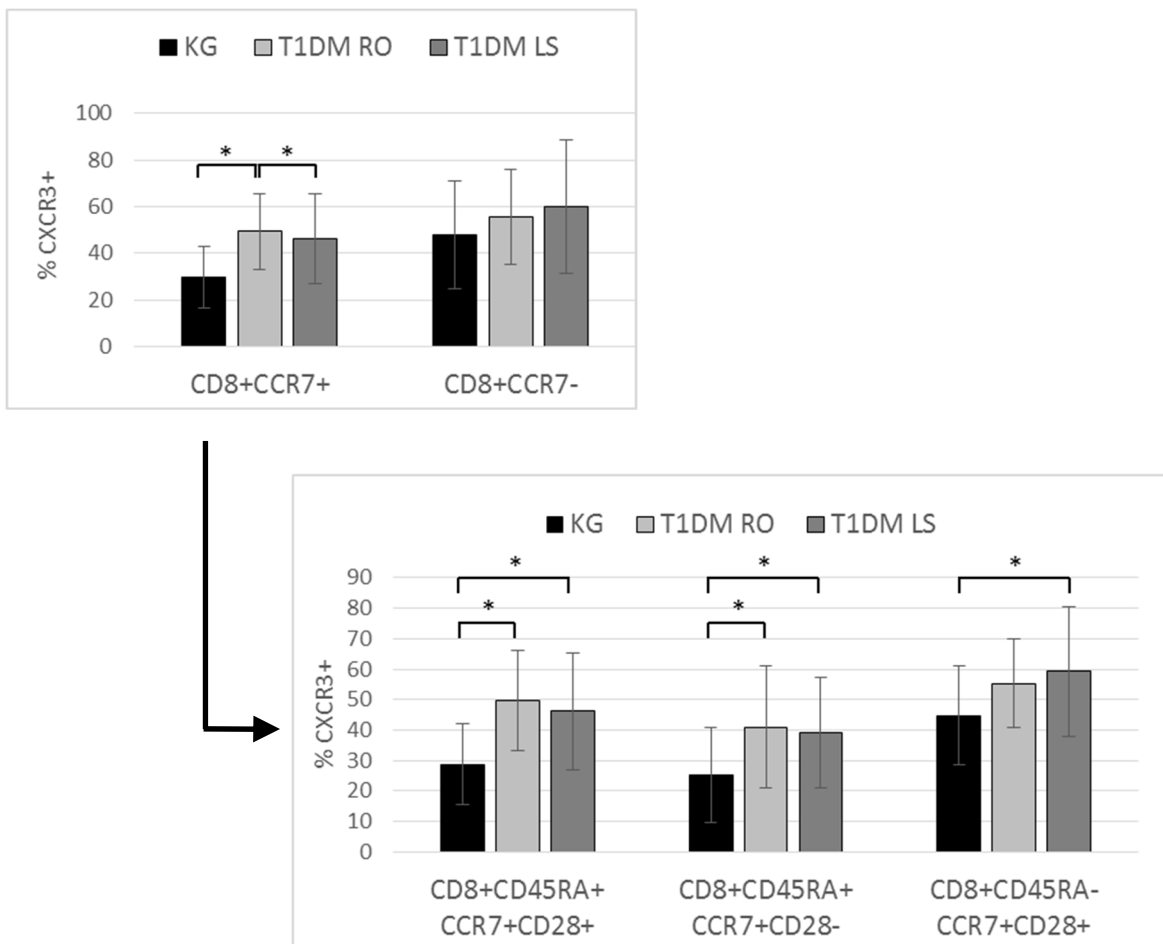


Abbildung 4.6 Vermehrte CXCR3-Expression auf CD8⁺CCR7⁺ Populationen

Dargestellt ist der Anteil an CXCR3⁺ Zellen im jeweils auf der X-Achse angegebenen Gate. Im Gegensatz zu CD8⁺CCR7⁻ Zellen exprimieren CD8⁺CCR7⁺ Populationen bei T1DM signifikant mehr CXCR3.

* $p < 0,05$ (Post-Hoc-Tests des KWT)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.6 Expression von CXCR3 auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 47)	Signifikanzen
		RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CXCR3	CD4 ⁺	8,81 [4,48]	10,42 [6,59]	7,60 [4,61]	p _{KWT} = 0,306
	CD4+CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	1,01 [0,57]	1,31 [0,69]	1,26 [1,27]	p _{KWT} = 0,321
	CD4+CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	19,71 [9,97]	20,82 [11,64]	16,31 [9,13]	p _{KWT} = 0,226
	CD4+CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	25,59 [14,83]	27,97 [18,12]	21,24 [12,53]	p _{KWT} = 0,259
	CD4+CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	1,75 [1,14]	3,72 [3,51]	2,57 [3,65]	p _{KWT} = 0,107
	CD8 ⁺	50,68 [16,04]	49,34 [20,81]	35,54 [14,45]	p _{KWT} = 0,005 p _{RO-KG} = 0,033 p _{LS-KG} = 0,030 p _{LS-RO} = 1,000
	CD8+CCR7 ⁺	49,35 [16,11]	46,40 [19,20]	29,95 [13,10]	p _{KWT} = 0,000 p _{RO-KG} = 0,004 p _{LS-KG} = 0,003 p _{LS-RO} = 1,000
	CD8+CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	49,59 [16,47]	46,14 [19,28]	28,74 [13,27]	p _{KWT} = 0,000 p _{RO-KG} = 0,002 p _{LS-KG} = 0,002 p _{LS-RO} = 1,000
	CD8+CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁻	41,03 [19,90]	39,16 [18,29]	25,13 [15,67]	p _{KWT} = 0,003 p _{RO-KG} = 0,049 p _{LS-KG} = 0,009 p _{LS-RO} = 1,000
	CD8+CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	55,33 [14,69]	59,18 [21,26]	44,70 [16,23]	p _{KWT} = 0,013 p _{RO-KG} = 0,261 p _{LS-KG} = 0,020 p _{LS-RO} = 1,000
	CD8+CCR7 ⁻	55,46 [20,35]	60,00 [28,78]	47,88 [23,02]	p _{KWT} = 0,169
	CD8+CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	55,39 [20,75]	60,94 [29,20]	49,87 [22,68]	p _{KWT} = 0,290
	CD8+CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	58,51 [23,88]	62,20 [29,80]	53,41 [27,25]	p _{KWT} = 0,542
	CD8+CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	56,13 [17,86]	58,75 [29,01]	45,47 [20,25]	p _{KWT} = 0,109
	CD8+CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	49,31 [24,27]	56,94 [31,73]	43,42 [27,74]	p _{KWT} = 0,303

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates).
Daten aus Ansatz 5 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn p_{KWT} < 0,05. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

4 Ergebnisse

4.4.2 Expression von CCR5 auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten

Innerhalb der CD4⁺ Population wurde der Chemokinrezeptor CCR5 vor allem auf CD4⁺CD45RA⁻ Zellen exprimiert (etwa 4 - 5mal häufiger als auf CD4⁺CD45RA⁺ Zellen). Es konnte kein signifikanter Unterschied der Expression von CCR5 auf CD4⁺ Lymphozyten beim Vergleich der Studiengruppen festgestellt werden.

Auch CD8⁺ Zellen exprimierten CCR5 in erster Linie innerhalb der CD8⁺CD45RA⁻ Population. Während in dieser Population alle Studiengruppen annähernd gleiche Expression von CCR5 zeigten, exprimierten CD8⁺CD45RA⁺ Zellen bei T1DM signifikant weniger CCR5 als bei der Kontrollgruppe.

Tabelle 4.7 und Abbildung 4.8 geben einen Überblick über die beschriebenen Daten. Die angewandte Gating-Strategie ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

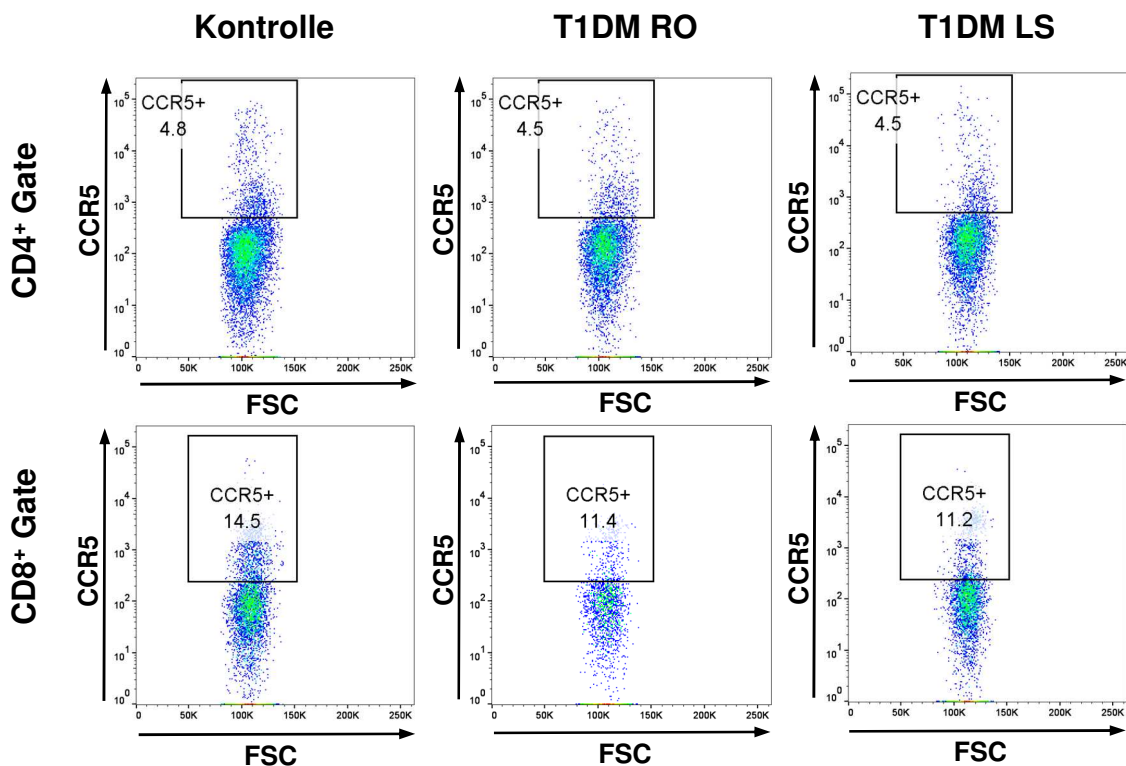


Abbildung 4.7 Gating der CCR5⁺ Population

Die gegateten Events sind im schwarzen Kästchen dargestellt. Die Zahl bedeutet den Prozentsatz von positiven Zellen des jeweiligen Gates. Es stellt sich jeweils unterhalb des Gates eine klare Negativpopulation dar.

4 Ergebnisse

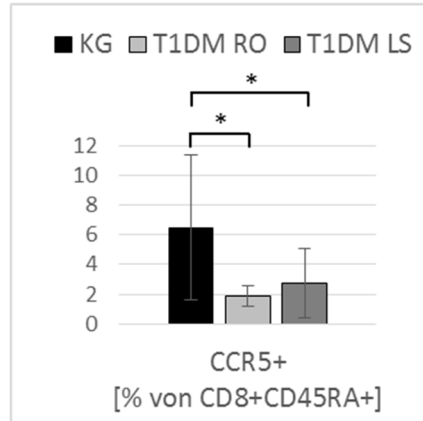


Abbildung 4.8 Verminderte CCR5-Expression auf CD8+CD45RA+ Zellen bei T1DM

Patienten mit T1DM exprimieren unabhängig von der Krankheitsdauer verminderte CCR5 auf CD8+CD45RA+ Zellen.

* $p < 0,05$ (Post-Hoc-Tests des KWT)

Tabelle 4.7 Expression von CCR5 auf CD4+ und CD8+ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 48)	Signifikanzen
		RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CCR5	CD4+	4,29 [1,50]	5,66 [2,83]	5,38 [3,05]	$p_{\text{KWT}} = 0,564$
	CD4+CD45RA+	2,05 [0,96]	2,27 [1,16]	2,69 [1,61]	$p_{\text{KWT}} = 0,406$
	CD4+CD45RA-	8,37 [3,54]	10,58 [4,85]	10,01 [5,32]	$p_{\text{KWT}} = 0,549$
	CD8+	10,08 [3,18]	10,82 [5,92]	15,55 [7,45]	$p_{\text{KWT}} = 0,009$ $p_{\text{RO-KG}} = 0,069$ $p_{\text{LS-KG}} = 0,036$ $p_{\text{LS-RO}} = 1,000$
	CD8+CD45RA+	1,89 [0,69]	2,71 [2,32]	6,46 [4,88]	$p_{\text{KWT}} = 0,000$ $p_{\text{RO-KG}} = 0,001$ $p_{\text{LS-KG}} = 0,001$ $p_{\text{LS-RO}} = 1,000$
	CD8+CD45RA-	33,63 [9,25]	35,18 [11,51]	38,63 [13,26]	$p_{\text{KWT}} = 0,326$

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 6 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn $p_{\text{KWT}} < 0,05$. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

4 Ergebnisse

4.4.3 Expression von CCR6 auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten

Um eine größtmögliche Zahl an Kontrollen zu gewährleisten, stammen die nachfolgenden Daten zur Expression von CCR6 soweit möglich aus Versuchsansatz 6 und lediglich für die genauere Betrachtung von CD4⁺ Subpopulationen auf Versuchsansatz 8 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41). Abbildung 4.9 zeigt das Gating.

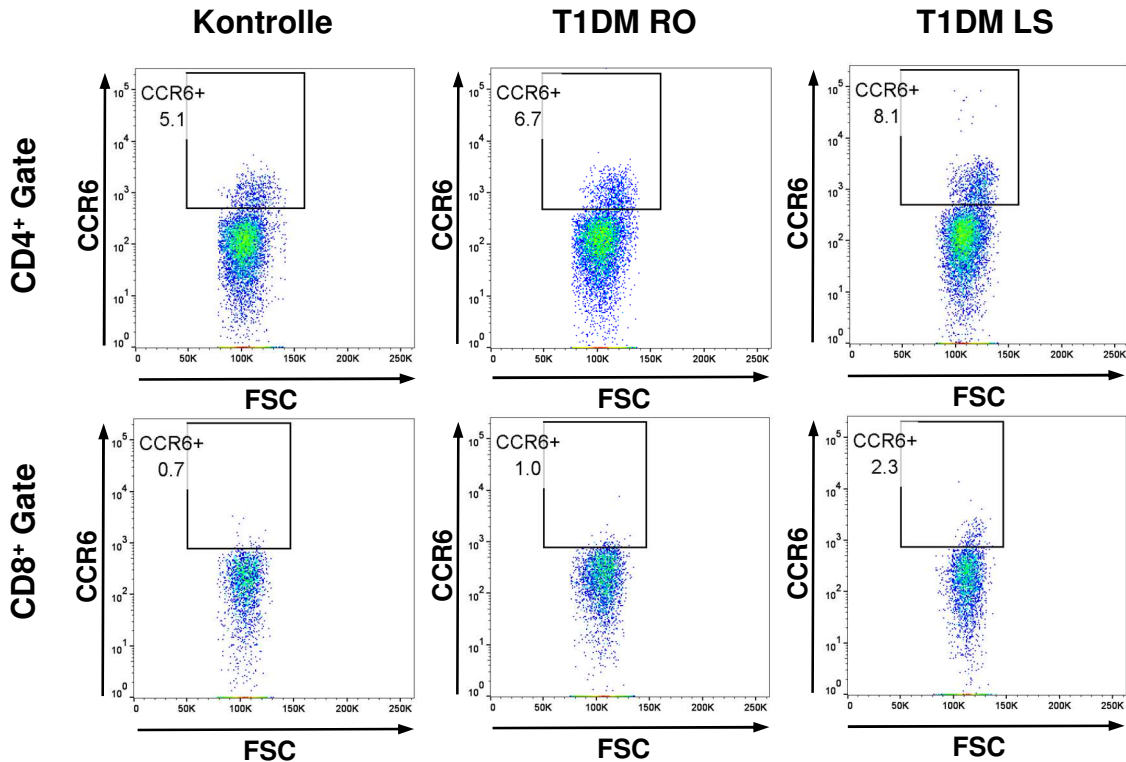


Abbildung 4.9 Gating der CCR6⁺ Population

Die gegateten Events sind im schwarzen Kästchen dargestellt mit Angabe des Prozentsatzes der jeweils im Gate enthaltenen Events. Es stellt sich jeweils unterhalb des Gates eine klare Negativpopulation dar.

CCR6 wurde in erster Linie auf CD4⁺ Lymphozyten exprimiert. Dies war zu erwarten, da CCR6 ein typischer Marker von Th17-Zellen ist, welche zu den CD4⁺ Lymphozyten zählen.

Beim Vergleich der Studiengruppen hinsichtlich der Expression von CCR6 auf den Subpopulationen der CD4⁺ Lymphozyten konnte eine signifikant erhöhte Expression auf CD4⁺CD45RA⁻ Zellen bei T1DM LS im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Bei genauerer Unterteilung in Subpopulationen war

4 Ergebnisse

dies vor allem für $CD4^+CD45RA^-CCR7^+CD28^+$ Zellen nachweisbar, wenngleich hier nur als statistischer Trend, was jedoch an der für diesen Vergleich geringen Anzahl an Kontrollen liegen kann (siehe Abbildung 4.10). Auch auf $CD8^+CD45RA^-$ Lymphozyten zeigte sich eine signifikant verstärkte Expression von CCR6 bei T1DM LS (siehe Tabelle 4.8 und Abbildung 4.10).

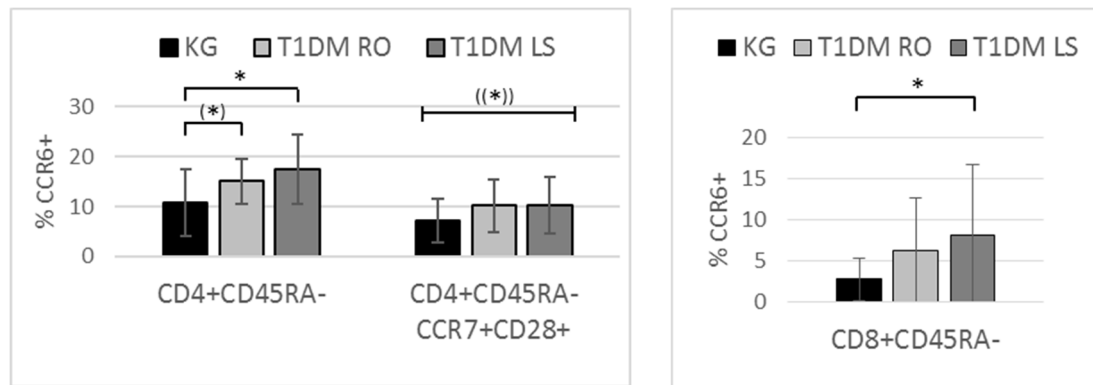


Abbildung 4.10 Erhöhte CCR6-Expression bei T1DM

Dargestellt ist der Anteil an CCR6⁺ Zellen im jeweils auf der X-Achse angegebenen Gate. Patienten mit T1DM exprimieren vermehrt CCR6 auf CD45RA⁻ Zellen.

((*)) $0,05 \leq p < 0,15$ (im KWT über alle Gruppen)

(*) $0,05 \leq p < 0,15$; * $p < 0,05$ (Post-Hoc-Tests des KWT)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.8 Expression von CCR6 auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 48 bzw. 27)	Signifikanzen
		RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CCR6	CD4 ⁺	6,23 [1,90]	8,06 [3,65]	5,26 [3,51]	p _{KWT} = 0,003 p _{PRO-KG} = 0,315 p _{LS-KG} = 0,003 p _{LS-RO} = 1,000
	CD4 ⁺ CD45RA ⁺	1,56 [0,89]	1,86 [0,73]	1,87 [1,20]	p _{KWT} = 0,322
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻	15,09 [4,53]	17,47 [6,92]	10,86 [6,68]	p _{KWT} = 0,001 p _{PRO-KG} = 0,073 p _{LS-KG} = 0,001 p _{LS-RO} = 1,000
	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	2,18 [0,60]	2,10 [1,04]	1,92 [1,24]	p _{KWT} = 0,357
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	10,14 [5,21]	10,29 [5,67]	7,20 [4,38]	p _{KWT} = 0,144
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	16,01 [4,05]	18,11 [9,26]	13,53 [7,04]	p _{KWT} = 0,196
	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	2,81 [0,94]	3,17 [2,23]	2,92 [2,15]	p _{KWT} = 0,914
	CD8 ⁺	2,05 [1,97]	2,45 [2,45]	1,03 [0,74]	p _{KWT} = 0,040
	CD8 ⁺ CD45RA ⁺	0,56 [0,33]	0,76 [0,86]	0,39 [0,26]	p _{KWT} = 0,183
	CD8 ⁺ CD45RA ⁻	6,30 [6,42]	8,17 [8,66]	2,77 [2,60]	p _{KWT} = 0,012 p _{PRO-KG} = 0,231 p _{LS-KG} = 0,018 p _{LS-RO} = 1,000

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 6 bzw. 8 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn p_{KWT} < 0,05. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

4.4.4 Betrachtung von CD161 auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten sowie von CCR6⁺CD161⁺ Zellen

Zur Charakterisierung bzw. Erkennung von Th17-Zellen wurde neben CCR6 auch CD161 bestimmt (siehe Abbildung 4.11 bzgl. des Gatings).

Die Expression konnte dabei nur auf einzelnen Subpopulationen in relevantem Ausmaß nachgewiesen werden. Dazu zählten die CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺, die CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁺ und die CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁺ Lymphozytenpopulation. Der Vergleich der Studiengruppen wies keine

4 Ergebnisse

Unterschiede der Häufigkeit von CD161⁺ Zellen in diesen Populationen auf (siehe Tabelle 4.9). Für alle weiteren Subpopulationen wurden nur sehr wenige CD161⁺ Events vom Durchflusszytometer detektiert.

Neben der isolierten Betrachtung von CD161 wurden auch CCR6⁺CD161⁺ Zellen im CD4⁺ Gate untersucht, um eine weitere Erhöhung der Spezifität der Erkennung von Th17-Zellen zu erreichen.

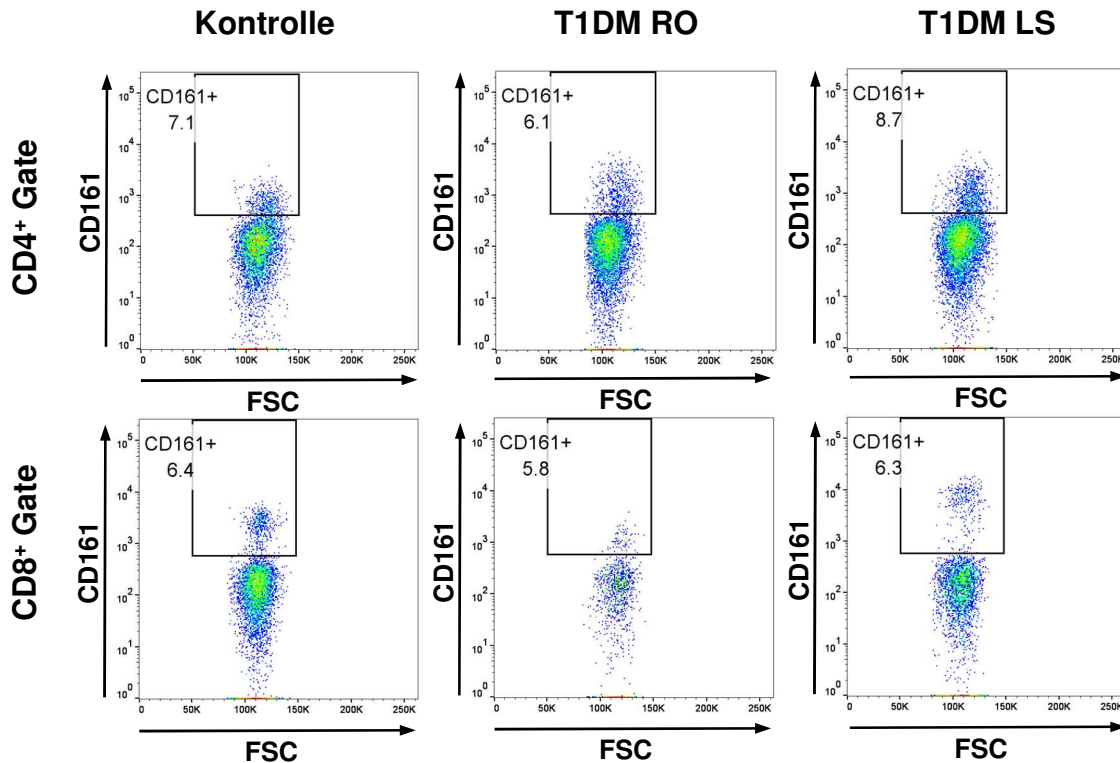


Abbildung 4.11 Gating der CD161⁺ Population

Die gegateten Events sind im schwarzen Kästchen dargestellt mit Angabe des Prozentsatzes der jeweils im Gate enthaltenen Events. Es stellt sich jeweils unterhalb des Gates eine klare Negativpopulation dar.

CD4⁺ Lymphozyten, die CD161 und CCR6 exprimierten, befanden sich fast alle innerhalb der CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺ bzw. der CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁺ Subpopulation. Die CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺ Population, für die auch schon eine Tendenz zur erhöhten Expression von CCR6 bei T1DM beschrieben wurde, zeigte dementsprechend die gleiche Tendenz auch für die Ko-Expression von CCR6 und CD161 (siehe Tabelle 4.9). Es ist zu beachten, dass hier wiederum aufgrund der geringen Probenmenge bei Kindern nur eine

4 Ergebnisse

geringe Eventzahl vom Durchflusszytometer gemessen werden konnte (im Schnitt etwa 120 bis 200 Events) .

Tabelle 4.9 Expression von CD161 auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 27)	Signifikanzen
		RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CD161	CD4 ⁺	6,37 [2,77]	8,11 [4,76]	7,30 [4,27]	p _{KWT} = 0,669
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	12,36 [6,12]	14,15 [7,08]	12,48 [6,10]	p _{KWT} = 0,708
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	20,27 [7,99]	23,17 [9,74]	20,81 [6,79]	p _{KWT} = 0,760
	CD8 ⁺	5,79 [2,30]	6,31 [4,00]	6,23 [3,82]	p _{KWT} = 0,945
	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	35,68 [13,67]	39,01 [19,29]	31,92 [15,94]	p _{KWT} = 0,455
CD161 ⁺ CCR6 ⁺	CD4 ⁺	2,32 [1,05]	2,60 [1,65]	1,99 [1,63]	p _{KWT} = 0,251
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	4,87 [3,17]	4,75 [2,99]	3,09 [2,22]	p _{KWT} = 0,097
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	7,62 [3,07]	8,01 [4,57]	6,12 [3,54]	p _{KWT} = 0,248

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 4 bzw. 8 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41). Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}).

4.4.5 Kombinierte Betrachtung der Expression von CCR6 und CCR5 auf CD4⁺ Lymphozyten

Eine Ko-Expression von CCR5 und CCR6 wurde nur auf einem kleinen Teil der CD4⁺ Lymphozyten nachgewiesen. Dabei handelte es sich wiederum vor allem um CD45RA⁻ Zellen, für die interessanterweise eine (leichte) Erhöhung des Anteils CCR5⁺CCR6⁺ Zellen bei T1DM LS festgestellt werden konnte (siehe Tabelle 4.10 und Abbildung 4.12). Gleichzeitig blieb der Anteil CCR5⁺CCR6⁺ Zellen an der CD4⁺CD45RA⁺ Lymphozytenpopulation unverändert bei T1DM im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4 Ergebnisse

Für CD8⁺ Lymphozyten wurde die CCR5⁺CCR6⁺ Subpopulation aufgrund der zu geringen Eventzahlen nicht weiter untersucht.

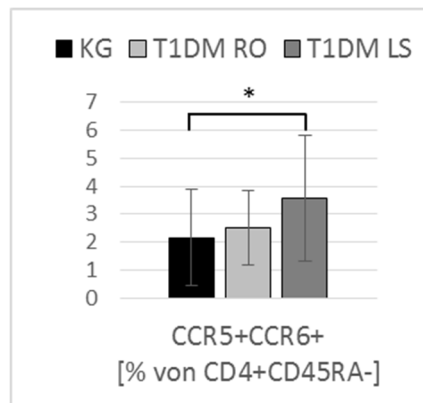


Abbildung 4.12 Erhöhte Ko-Expression von CCR5 und CCR6 bei T1DM
Bei T1DM LS ist nicht nur die CCR6-Expression, sondern auch die Ko-Expression von CCR5 und CCR6 erhöht.
* $p < 0,05$ (Post-Hoc-Tests des KWT)

Tabelle 4.10 Ko-Expression von CCR5 und CCR6 auf CD4⁺ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 48)	Signifikanzen
		RO (n = 11)	LS (n = 19)		
CCR5 ⁺ CCR6 ⁺	CD4 ⁺	1,68 [0,65]	2,26 [1,04]	1,64 [1,18]	$p_{\text{KWT}} = 0,006$ $p_{\text{RO-KG}} = 1,000$ $p_{\text{LS-KG}} = 0,004$ $p_{\text{LS-RO}} = 0,382$
	CD4 ⁺ CD45RA ⁺	1,20 [0,81]	1,33 [0,65]	1,33 [1,01]	$p_{\text{KWT}} = 0,599$
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻	2,50 [1,32]	3,57 [2,24]	2,15 [1,72]	$p_{\text{KWT}} = 0,009$ $p_{\text{RO-KG}} = 0,905$ $p_{\text{LS-KG}} = 0,007$ $p_{\text{LS-RO}} = 0,601$

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 6 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn $p_{\text{KWT}} < 0,05$. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

4.5 Zytokinproduktion der Lymphozytenpopulationen

In einer zusätzlichen Versuchsreihe wurde nach vorheriger unspezifischer Stimulation der Lymphozyten die Produktion von Zytokinen auf Einzelzellebene bestimmt, wobei durch zusätzliche Färbung von CD45RO, CCR7 und CD28 die

4 Ergebnisse

Zuordnung zu den Subpopulationen (naiv, Gedächtnis-/Effektorzelle) möglich war. Zur Charakterisierung der Kapazität der Zellen zur proinflammatorischen Immunantwort wurden IFN γ , TNF α und IL-17 bestimmt, aber auch IL-4 als Vertreter der Th2-Antwort gefärbt. Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14 zeigen das jeweilige Gating.

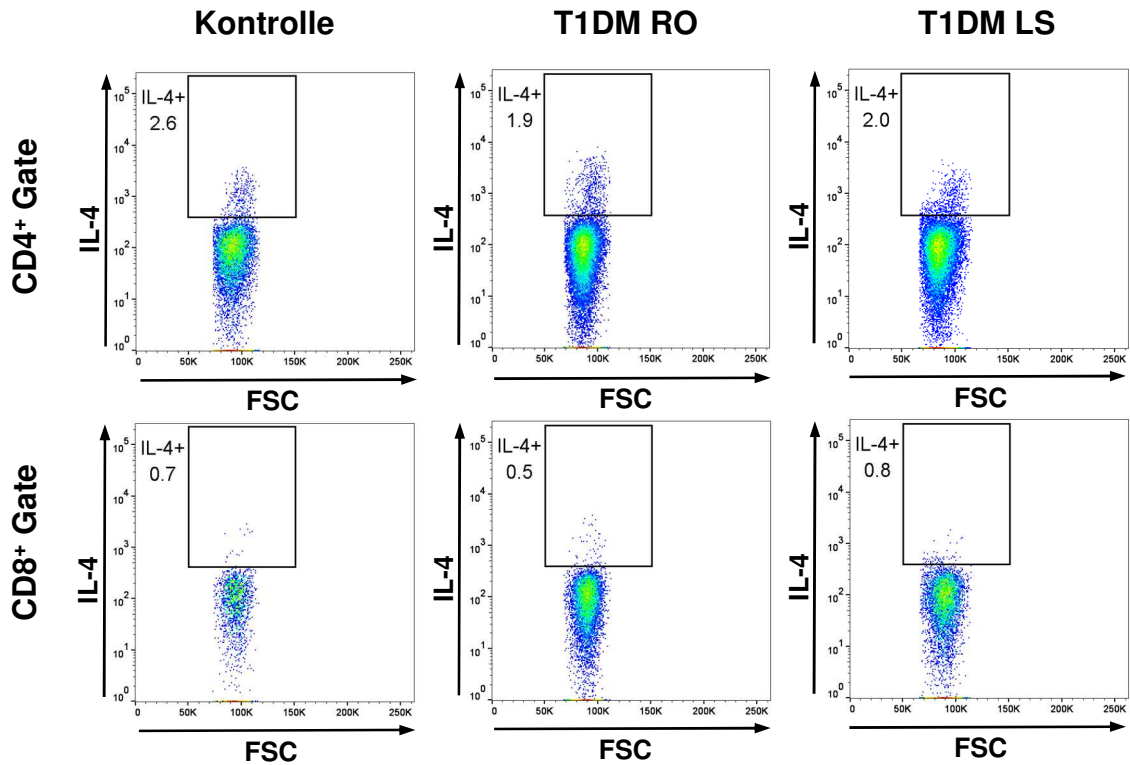


Abbildung 4.13 Gating von IL-4

Die gategeten Events befinden sich im schwarzen Kästchen. Die Zahlen geben den Prozentsatz der Events im Gate an. Es sind klare Negativ- und Positivpopulationen erkennbar.

4 Ergebnisse

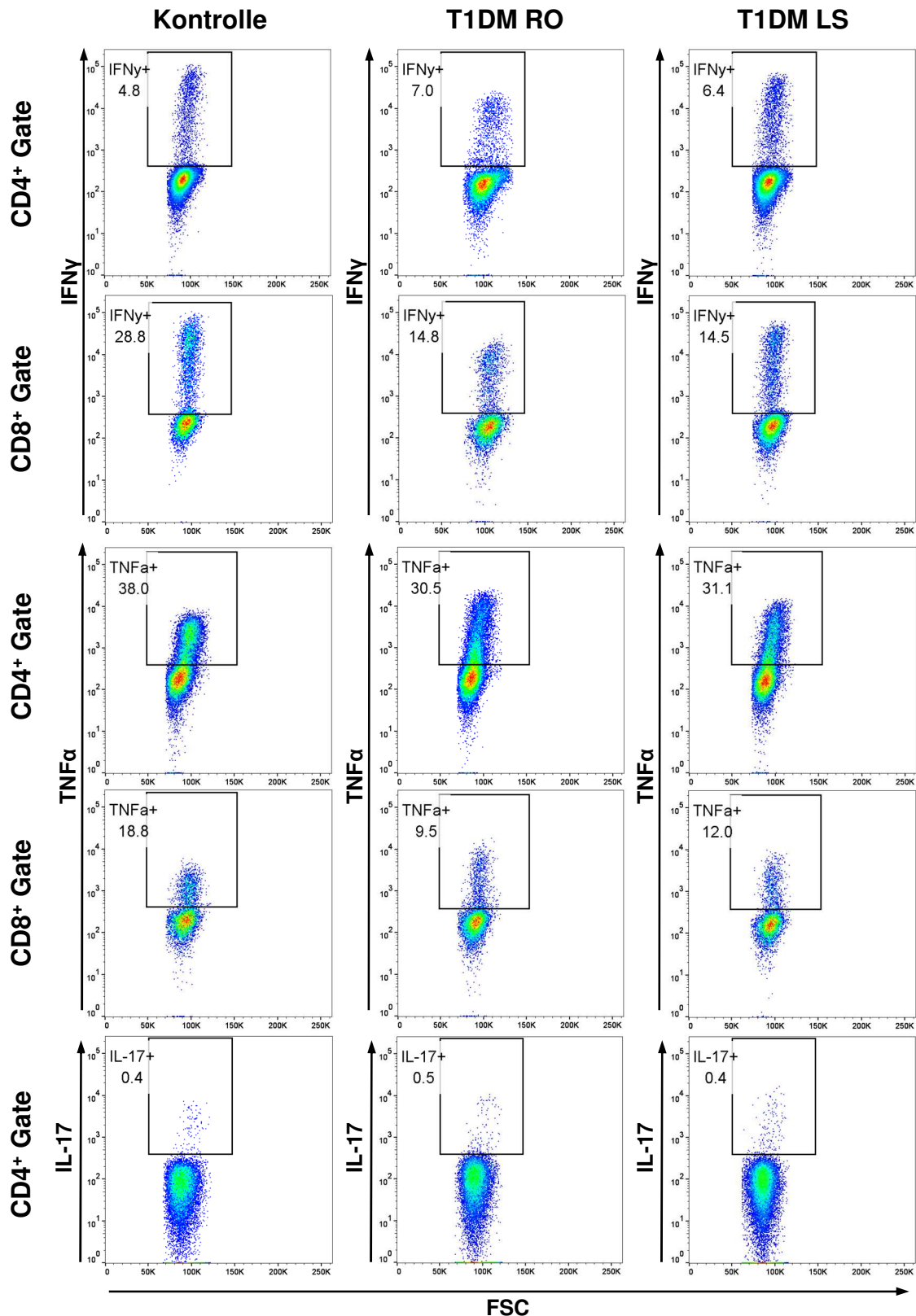


Abbildung 4.14 Gating von IFN γ , TNF α und IL-17
Die gegateten Events befinden sich im schwarzen Kästchen. Die Zahlen geben den Prozentsatz der Events im Gate an. Es sind klare Negativ- und Positivpopulationen erkennbar.

4 Ergebnisse

4.5.1 Charakterisierung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α

Eine signifikant erhöhte Produktion von IFN γ lag bei T1DM im Vergleich zur Kontrollgruppe innerhalb der CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺ Population vor (siehe Abbildung 4.15 und Tabelle 4.11). Die ebenfalls vorliegende signifikante Erhöhung des IFN γ -produzierenden Anteils der CD4⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD28⁺ ist aufgrund der geringen Ausprägung, sowie des allgemein geringen Anteils IFN γ -produzierender Zellen in dieser Population zurückhaltend zu bewerten.

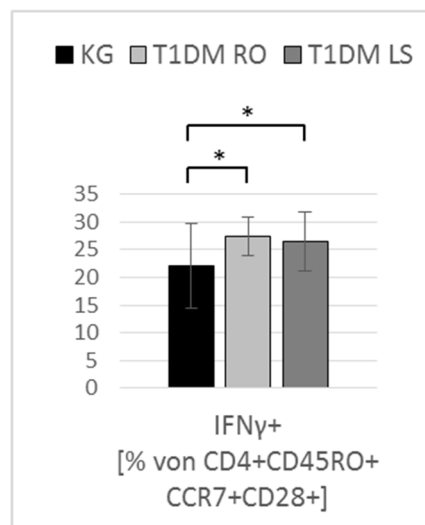


Abbildung 4.15 Vermehrte IFN γ -Expression in CD4⁺ Zellen bei T1DM
Innerhalb der CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺ Population zeigt sich einer signifikante IFN γ -Überexpression bei T1DM.
* $p < 0,05$ (Post-Hoc-Tests des KWT)

Für CD8⁺ Lymphozytenpopulationen konnte trotz des Vorliegens einzelner statistischer Trends keine klare Veränderung der IFN γ -Produktion bei T1DM beschrieben werden.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.11 Produktion von IFN γ in CD4 $^+$ und CD8 $^+$ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 48)	Signifikanzen
		RO (n = 11)	LS (n = 18)		
IFN γ	CD4 $^+$	6,18 [1,86]	8,03 [3,58]	7,32 [4,37]	$p_{\text{KWT}} = 0,420$
	CD4 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	1,46 [0,59]	1,35 [0,84]	1,06 [0,68]	$p_{\text{KWT}} = 0,048$ $p_{\text{RO-KG}} = 0,068$ $p_{\text{LS-KG}} = 0,459$ $p_{\text{LS-RO}} = 1,000$
	CD4 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	27,44 [3,51]	26,49 [5,23]	22,09 [7,63]	$p_{\text{KWT}} = 0,002$ $p_{\text{RO-KG}} = 0,024$ $p_{\text{LS-KG}} = 0,016$ $p_{\text{LS-RO}} = 1,000$
	CD4 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	31,48 [4,99]	32,89 [7,96]	28,61 [8,37]	$p_{\text{KWT}} = 0,084$
	CD4 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	4,94 [2,76]	4,84 [3,54]	4,19 [3,23]	$p_{\text{KWT}} = 0,492$
	CD8 $^+$	15,27 [3,31]	13,36 [5,94]	21,01 [11,98]	$p_{\text{KWT}} = 0,107$
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	3,75 [1,95]	3,84 [2,22]	4,18 [2,92]	$p_{\text{KWT}} = 0,960$
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^+$ CD28 $^-$	9,05 [7,07]	7,94 [4,20]	12,06 [12,06]	$p_{\text{KWT}} = 0,645$
	CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	57,78 [9,91]	55,09 [16,17]	51,44 [18,36]	$p_{\text{KWT}} = 0,563$
	CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	84,86 [8,41]	81,82 [7,92]	76,00 [13,49]	$p_{\text{KWT}} = 0,077$
	CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^-$ CD28 $^-$	86,57 [9,66]	83,11 [11,32]	79,23 [15,62]	$p_{\text{KWT}} = 0,296$
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	25,59 [9,29]	23,11 [12,33]	27,52 [13,39]	$p_{\text{KWT}} = 0,498$
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^-$ CD28 $^-$	59,78 [8,99]	52,99 [9,41]	53,72 [17,52]	$p_{\text{KWT}} = 0,323$

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 11 (siehe Tabelle 3.9 Seite 43).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn $p_{\text{KWT}} < 0,05$. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

Auch die TNF α -Produktion unterschied sich zwischen T1DM und Kontrollpatienten (siehe Tabelle 4.12 und Abbildung 4.16). Im Gegensatz zu den Unterschieden der IFN γ -Produktion waren diese jedoch nicht in CD4 $^+$ Lymphozyten, sondern in CD8 $^+$ Lymphozyten zu finden. Außerdem war die Produktion von TNF α in CD8 $^+$ Lymphozyten im Gegensatz zur Produktion von IFN γ in CD4 $^+$ Lymphozyten bei T1DM im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger. Dies konnte mit Ausnahme der CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$ Subpopulation in allen CD8 $^+$

4 Ergebnisse

Subpopulationen als Trend beobachtet werden und erreichte für CD8⁺CD45RO⁺CCR7⁻CD28⁺ Lymphozyten Signifikanzniveau.

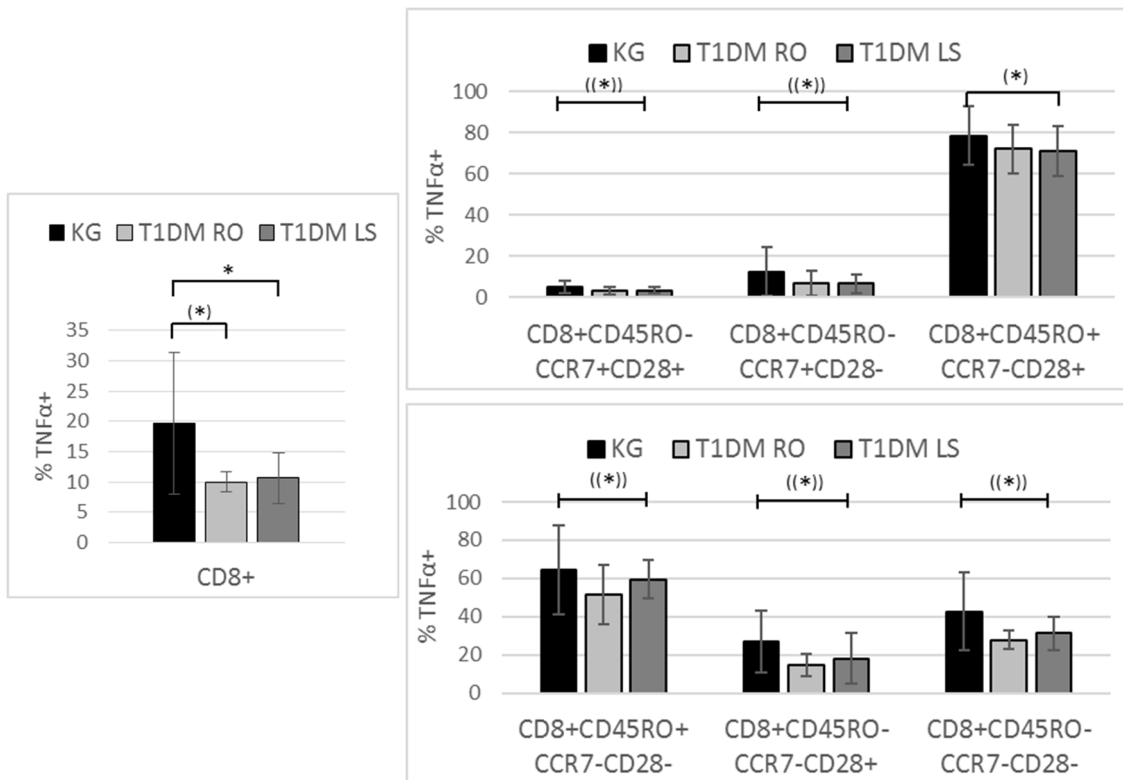


Abbildung 4.16 Verminderte TNF α -Produktion in CD8⁺ Zellen bei T1DM
 Dargestellt ist der Anteil an TNF α ⁺ Zellen im jeweils auf der X-Achse angegebenen Gate. CD8⁺ Zellen produzieren bei T1DM signifikant weniger TNF α . Dies erstreckt sich über fast alle untersuchten Subpopulationen, wobei hier statistisch meist nur Trendniveau erreicht wird. Graphisch scheint die Minderproduktion vor allem CD45RO⁻CCR7⁻ Zellen zu betreffen.
 ((*)) $0,05 \leq p \leq 0,15$ (im KWT über alle Gruppen)
 (*) $0,05 \leq p < 0,15$; * $p < 0,05$ (Post-Hoc-Tests des KWT)

Zusammenfassend wurde somit beobachtet, dass CD4⁺ Lymphozyten bei T1DM im Vergleich zu Kontrollpatienten zu einer geringgradig erhöhten Produktion von IFN γ neigen, vor allem in der CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺ Subpopulation, während CD8⁺ Lymphozyten bei T1DM im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Defizit der TNF α -Produktion aufwiesen. Ein relevanter Unterschied zwischen T1DM RO und T1DM LS bestand dabei nicht. Es konnte keine einzelne CD8⁺ Subpopulation hauptverantwortlich gemacht werden für die

4 Ergebnisse

niedrigere TNF α -Produktion bei T1DM, sondern es handelte sich hierbei um ein generelles Phänomen.

Tabelle 4.12 Produktion von IFN γ und TNF α in CD4 $^+$ und CD8 $^+$ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 42)	Signifikanzen
		RO (n = 6)	LS (n = 12)		
TNF α	CD4 $^+$	31,09 [8,36]	31,21 [7,63]	36,36 [14,86]	p _{KWT} = 0,498
	CD4 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	21,85 [8,59]	19,66 [9,57]	23,92 [14,30]	p _{KWT} = 0,729
	CD4 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	75,16 [5,87]	71,87 [8,22]	74,96 [14,26]	p _{KWT} = 0,272
	CD4 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	78,74 [2,00]	76,33 [8,17]	80,22 [10,83]	p _{KWT} = 0,207
	CD4 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	18,66 [2,88]	21,42 [10,52]	25,43 [15,82]	p _{KWT} = 0,875
	CD8 $^+$	10,04 [1,64]	10,63 [4,25]	19,64 [11,68]	p _{KWT} = 0,008 p _{RO-KG} = 0,129 p _{LS-KG} = 0,023 p _{LS-RO} = 1,000
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	3,18 [1,80]	3,12 [1,47]	4,93 [3,04]	p _{KWT} = 0,139
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^+$ CD28 $^-$	6,74 [5,94]	6,46 [4,75]	12,26 [11,88]	p _{KWT} = 0,139
	CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^+$ CD28 $^+$	39,48 [15,00]	44,93 [11,01]	51,98 [19,75]	p _{KWT} = 0,305
	CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	71,89 [11,89]	71,15 [12,07]	78,38 [14,33]	p _{KWT} = 0,047 p _{RO-KG} = 0,414 p _{LS-KG} = 0,084 p _{LS-RO} = 1,000
	CD8 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^-$ CD28 $^-$	51,42 [15,57]	59,59 [9,98]	64,63 [23,25]	p _{KWT} = 0,080
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^-$ CD28 $^+$	14,52 [5,89]	18,17 [13,43]	26,99 [15,91]	p _{KWT} = 0,065
	CD8 $^+$ CD45RO $^-$ CCR7 $^-$ CD28 $^-$	27,68 [4,86]	31,27 [8,61]	42,66 [20,22]	p _{KWT} = 0,071

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 12 (siehe Tabelle 3.9 Seite 43).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}) sowie der Post-Hoc-Tests, wenn p_{KWT} < 0,05. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe).

4.5.2 Charakterisierung der IL-17-Produktion

Die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17, welches das Signaturzytokin der Th17-Zelle ist, wurde innerhalb der CD4 $^+$ Lymphozytenpopulation untersucht. Erwartungsgemäß konnte nur in sehr wenigen CD4 $^+$ Lymphozyten

4 Ergebnisse

IL-17-Produktion nachgewiesen werden, wobei der Anteil IL-17-produzierender Zellen an der CD4⁺CCR6⁺ Lymphozytenpopulation wesentlich höher war, als an CD4⁺CCR6⁻ Lymphozytenpopulation, und in der CD4⁺CCR6⁺CD45RA⁻CD28⁺ Population mit Abstand am meisten IL-17-Produktion nachgewiesen wurde (siehe Tabelle 4.13). Signifikante Unterschiede der IL-17-Produktion zwischen den Studiengruppen wurden nicht beobachtet.

Auf ein Gating nach RORγt⁺ und RORγt⁻ wurde verzichtet, da das gemessene Fluoreszenzsignal als unspezifisch beurteilt werden musste.

Tabelle 4.13 IL-17-Produktion in CD4⁺ Lymphozytenpopulationen

Marker	Gate	T1DM		KG (n = 46)	Signifikanzen
		RO (n = 6)	LS (n = 13)		
IL-17	CD4 ⁺	0,49 [0,21]	0,45 [0,21]	0,62 [0,37]	p _{KWT} = 0,475
	CD4 ⁺ CCR6 ⁺	4,56 [1,44]	4,00 [1,43]	4,34 [2,42]	p _{KWT} = 0,806
	CD4 ⁺ CCR6 ⁺ CD45RA ⁺ CD28 ⁺	2,09 [1,87]	1,26 [1,02]	1,60 [2,08]	p _{KWT} = 0,521
	CD4 ⁺ CCR6 ⁺ CD45RA ⁻ CD28 ⁺	6,04 [1,80]	5,44 [1,67]	6,40 [3,15]	p _{KWT} = 0,684
	CD4 ⁺ CCR6 ⁺ CD45RA ⁻ CD28 ⁻	9,65 [15,10]	5,46 [8,54]	2,69 [5,63]	p _{KWT} = 0,191
	CD4 ⁺ CCR6 ⁺ CD45RA ⁺ CD28 ⁻	5,83 [9,22]	1,15 [2,36]	1,53 [2,27]	p _{KWT} = 0,375
	CD4 ⁺ CCR6 ⁻	0,31 [0,13]	0,27 [0,16]	0,40 [0,25]	p _{KWT} = 0,238

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 15 (siehe Tabelle 3.9 Seite 43).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}).

4.5.3 Charakterisierung der Produktion von IL-4 und IL-10

Die Produktion des Th2-Zytokins IL-4 wurde am stärksten in der CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁺ Subpopulation nachgewiesen. Diese erreichten in der Kontrollgruppe etwa 6% IL-4-produzierende Zellen während der Anteil IL-4-produzierender Zellen in dieser Population bei T1DM RO und T1DM LS mit jeweils etwa 4,5% bzw. 5,5% niedriger lag (statistischer Trend). Für andere CD4⁺ Lymphozytenpopulationen wurden keine relevanten Veränderungen der IL-4-Produktion beim Vergleich der Studiengruppen beobachtet (siehe Tabelle 4.14).

4 Ergebnisse

CD8⁺ Lymphozyten produzierten nur zu einem geringen Anteil IL-4 und es wurden keine signifikanten Unterschiede der IL-4-Produktion beim Vergleich der Studiengruppen gefunden.

Eine Produktion IL-10 wurde sowohl in CD4⁺, als auch in CD8⁺ Lymphozyten nur vereinzelt gemessen, weswegen kein genauere Vergleich der Studiengruppen erfolgte.

Tabelle 4.14 Produktion von IL-4 in CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten

Marker	Gate	T1DM		KG (n _{IL-4} = 48, n _{IL-10} = 47)	Signifikanzen
		RO (n = 11)	LS (n = 18)		
IL-4	CD4 ⁺ gesamt	1,55 [0,84]	2,04 [1,38]	2,35 [1,21]	p _{KWT} = 0,052
	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	0,95 [0,67]	1,01 [0,82]	0,93 [0,82]	p _{KWT} = 0,885
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	1,56 [1,16]	2,18 [1,38]	2,14 [1,15]	p _{KWT} = 0,190
	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	4,43 [2,09]	5,39 [2,79]	6,73 [3,51]	p _{KWT} = 0,073
	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	0,54 [0,37]	0,69 [0,99]	0,95 [1,07]	p _{KWT} = 0,113
	CD8 ⁺	0,97 [0,60]	0,88 [0,43]	1,20 [0,81]	p _{KWT} = 0,465
	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	0,92 [0,67]	0,81 [0,43]	1,20 [0,97]	p _{KWT} = 0,395
	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁻	0,71 [0,73]	0,44 [0,36]	0,78 [1,08]	p _{KWT} = 0,770
	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	1,63 [1,39]	2,03 [1,03]	1,92 [1,68]	p _{KWT} = 0,420
	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	1,32 [0,91]	1,74 [1,32]	1,84 [1,47]	p _{KWT} = 0,478
	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	0,96 [0,63]	0,58 [0,51]	1,22 [1,28]	p _{KWT} = 0,093
	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁺	0,79 [0,54]	0,67 [0,55]	1,22 [0,95]	p _{KWT} = 0,073
	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁻	0,50 [0,56]	0,51 [0,49]	0,71 [0,85]	p _{KWT} = 0,728
IL-10	CD4 ⁺	0,75 [0,70]	1,00 [0,74]	0,84 [0,58]	p _{KWT} = 0,167
	CD8 ⁺	0,60 [0,57]	0,67 [0,39]	0,92 [0,83]	p _{KWT} = 0,378

Alle Angaben als MW [SD] (in % des jeweils in Klammern angegebenen Gates). Daten aus Ansatz 13 und 14 (siehe Tabelle 3.9 Seite 43). Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (p_{KWT}).

4.6 Regulatorische T-Zellen

Die Anzahl von T_{reg} wurde anhand der CD4⁺ Zellen bestimmt, welche einen CD25⁺CD127⁻ Phänotyp aufwiesen. Hierbei wurden auch Zellen, welche CD127 in niedrigen Mengen exprimierten als negativ angesehen, da eine geringe CD127-Expression für T_{reg} typisch ist. Das Gating der Population ist in Abbildung 4.17 dargestellt. T1DM LS wiesen einen signifikant höheren Anteil an T_{reg} auf als die Kontrollgruppe, wobei T1DM RO zwar ebenfalls einen erhöhten Mittelwert zeigten, dies jedoch statistisch kein Signifikanzniveau erreichte (siehe Abbildung 4.17). Die FoxP3-Expression wurde nicht genauer ausgewertet, da das Fluoreszenzsignal als unspezifisch erachtet werden musste. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.15 dargestellt.

4 Ergebnisse

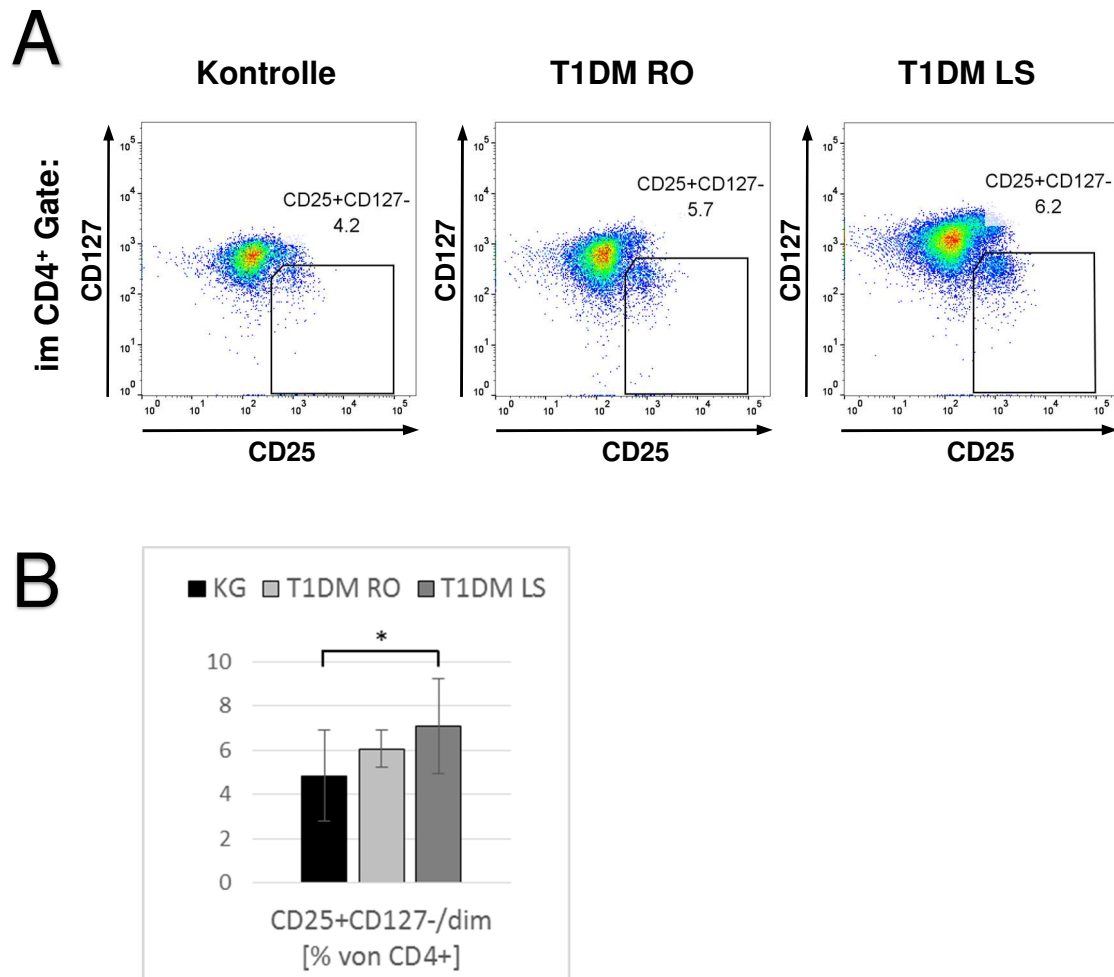


Abbildung 4.17 T_{reg}-Gating und vermehrtes Vorkommen bei T1DM LS
Mithilfe von CD25 und CD127 können T_{reg} gut charakterisiert werden (A, das schwarze Kästchen gibt das Gate an, die Zahl den Prozentsatz der Events innerhalb des Gates). Es zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen dieser Population bei T1DM, vor allem bei längerer Krankheitsdauer (B).

* $p < 0,05$ (Post-Hoc-Test des KWT)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.15 T_{reg} im Vergleich der Studiengruppen

Marker (Gate)	T1DM		KG	Signifikanzen
	RO	LS		
$CD25^+CD127^{-dim} (CD4^+)$	6,07 [0,84]	7,09 [2,13]	4,85 [2,07]	$p_{KWT} = 0,002$ $p_{RO-KG} = 0,161$ $p_{LS-KG} = 0,002$ $p_{LS-RO} = 1,000$

Alle Angaben als MW \pm SD [in % von CD4⁺]. Daten aus Ansatz 7 (siehe Tabelle 3.8 Seite 41).

Signifikanzangaben als p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests (pKWT) sowie der Post-Hoc-Tests. Für die Post-Hoc-Tests wurden die verglichenen Gruppen jeweils annotiert (RO = T1DM RO; LS = T1DM LS; KG = Kontrollgruppe)

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten liefern Informationen über die Expression verschiedener Oberflächenproteine und Zytokine in T-Zellen aus peripherem Blut von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1. Sie erlauben dadurch Rückschlüsse auf die Verteilung von B-Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, auf die Differenzierung dieser Zellen hinsichtlich eines naiven, Gedächtnis- bzw. Effektor-Phänotyps sowie auf potenzielle Veränderungen ihres Migrationsverhaltens oder ihrer Th1-, Th2- bzw. Th17-Effektorfunktion.

5.1 Verteilung von B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und natürlichen Killerzellen bei T1DM

Wenngleich der Fokus der Studie in erster Linie auf T-Zellen lag, wurde zuerst ein allgemeiner Immunstatus erhoben, welche auch die Quantifizierung von B-Zellen und NK- bzw. NKT-Zellen umfasste. Dabei konnten kaum Unterschiede zwischen T1DM und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Verteilung von B- bzw. T-Zellen sowie der Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen festgestellt werden. Da T1DM in erster Linie als T-Zell-vermittelte Erkrankung betrachtet wird, war das Fehlen von Unterschieden in der B-Zell-Population zu erwarten, was auch schon in früheren Studien bestätigt wurde.^{122,123} Verschiebungen der T-Zell-Populationen wären zwar denkbar, jedoch existiert in Übereinstimmung mit unseren Daten bereits eine Vielzahl an Studien, die keine numerische Veränderung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen bei T1DM gefunden haben.^{115,122-124} Widersprüchliche Ergebnisse gab es in diesem Zusammenhang in Bezug auf den CD4/CD8-Quotienten. Während Hedman et al. eine Erhöhung dieser Quotienten beobachteten, fanden wir in Übereinstimmung mit einer Studie von Akesson et al. keine Veränderung zwischen T1DM und der Kontrollgruppe.^{115,125} Insgesamt spricht diese Datenlagen am wahrscheinlichsten dafür, dass für das Aufdecken von krankheitsbedingten Unterschieden eine genauere Unterteilung der T-Zellen in Subpopulationen notwendig ist, um einzelne spezifische Veränderungen

5 Diskussion

erkennen zu können, welche bei zu grober Betrachtung infolge des erhöhten „Hintergrundrauschens“ verkannt werden.

Anders als bei B-Zellen und CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen konnte in unserer Studie für NK-Zellen (CD3⁻CD56⁺) eine Verminderung bei T1DM RO im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, was im Einklang steht mit mehreren Studien an T1DM sowie am Mausmodell des T1DM.^{122,123,126-130} Auch die Normalisierung des NK-Zell-Anteils im Verlauf der Erkrankung deckt sich mit den Ergebnissen eines Teils dieser Studien^{127,130}, wohingegen andere^{126,128} eine Persistenz der Erniedrigung in Remission bzw. bei langjährigem Krankheitsverlauf beschrieben haben. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass bei Studien aus den 1980er Jahren CD57 (Leu 7) und CD16 (Leu 11a) als NK-Zell-Marker verwendet wurden, wodurch davon auszugehen ist, dass die damals beschriebene Zellpopulation nicht vollkommen identisch mit der in späteren Studien bzw. in unserer Studie beschriebenen Zellpopulation (CD3⁻CD56⁺) ist. Dies kann Ursache nicht vollkommen übereinstimmender Ergebnisse sein. Es ist anzumerken, dass eine Studie von Lee et al.¹³¹ trotz Verwendung von CD3⁻CD56⁺ als NK-Zell-Marker im Widerspruch zu unseren Daten und zu den Ergebnissen von Qin et al. keine quantitative Veränderung des NK-Zell-Kompartiments bei T1DM gefunden hat. Da in dieser Studie vor allem Erwachsene Patienten (>20 Jahre) untersucht wurden, ist ein Einfluss des Alters nicht auszuschließen.

Neben NK-Zellen wurden in unserer Studie auch NKT-Zellen (CD3⁺CD56⁺) untersucht, welche ebenfalls Unterschiede zwischen T1DM und der Kontrollgruppe aufwiesen. Im Gegensatz zu den NK-Zellen waren NKT-Zellen jedoch bei T1DM LS vermindert vorzufinden, während T1DM RO normale Zellzahlen aufwies. Der Vergleich dieser Beobachtung mit Daten früherer Studien ist sehr schwierig, da zum einen die NKT-Zell-Population oft anhand unterschiedlicher Merkmale charakterisiert wurde und zum anderen die Ergebnisse dieser Studien stark widersprüchlich sind. So wurden in zwei Studien^{117,132} ebenfalls Hinweise auf eine quantitative Verminderung der NKT-Zellen bei Patienten mit T1DM gefunden, während zwei weitere Studien^{122,131} keine signifikante Veränderung feststellten und schließlich eine fünfte Studie¹³³

5 Diskussion

sogar vermehrt NKT-Zellen bei T1DM vorfand. Verständlicher werden diese Widersprüche jedoch, wenn man die von Berzins et al. durchgeführte Studie betrachtet, in der zumindest im Mausmodell des T1DM die Quantifizierung von NKT-Zellen im Blut nicht mit den Verhältnissen in verschiedenen Geweben korrelierte.¹³⁴ Die Autoren schlossen damals aus ihren Ergebnissen darauf, dass die Quantifizierung von NKT-Zellen im Blut keine Rückschlüsse auf die Verhältnisse im Gewebe zulässt. Für Studien am humanen T1DM ergibt sich jedoch dabei das Problem, dass peripheres Blut nach wie vor das einzige Untersuchungsmaterial darstellt, welches mit für den Patienten zumutbarer Belastung gewonnen werden kann, weswegen man hier auf dieses Material angewiesen ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich in unserer Studie im Einklang mit mehreren früheren Studien eine quantitative Verminderung von NK-Zellen bei T1DM RO zeigte, während die beobachtete quantitative Verminderung von NKT-Zellen bei T1DM LS in Zusammenschau mit früheren Ergebnissen sehr zurückhaltend zu beurteilen ist. Eine genauere Charakterisierung dieser beiden Zellgruppen erfolgte nicht, da die Studie vor allem auf die Charakterisierung von (nicht-NK-)T-Zellen ausgerichtet war.

5.2 Naive, Gedächtnis- und Effektorzellen bei T1DM

Für Autoimmunerkrankungen wurden bereits Veränderungen der T-Zell-Oberflächenmerkmale beschrieben, welche den Veränderungen im Rahmen der Immunoseneszenz entsprechen.^{75,78} Um derartige Veränderungen auch für T1DM zu charakterisieren, wurden in unserer Studie T-Zellen hinsichtlich verschiedener Charakteristika der Immunoseneszenz untersucht.

5.2.1 Veränderung der CD28-Expression bei T1DM

Unsere Daten wiesen weder in CD4⁺ noch in CD8⁺ Lymphozyten signifikante Verminderung der CD28-Expression bei T1DM RO auf. Im Gegensatz dazu wurde bei T1DM LS eine Erhöhung der CD28-Expression in CD4⁺ Lymphozyten beobachtet, die allerdings nur sehr gering ausgeprägt war. Wir denken deshalb, dass anhand der hier vorliegenden Daten unabhängig von der Krankheitsdauer

5 Diskussion

keine klare Veränderung der Expression von CD28 bei T1DM festgestellt werden kann. Uns sind lediglich zwei weitere Studie zur CD28-Expression bei T1DM bekannt. Die erste konnte – gemessen an CD28-mRNA – übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ebenfalls keine Veränderung feststellen.¹³⁵ Eine zweite Studie beschrieb im Gegensatz hierzu eine erhöhte CD28-Expression auf CD3⁺ Zellen.¹³⁶ Allerdings wurden in dieser Studie Patienten im Alter von 18 bis 62 Jahren untersucht, bei denen ein langjährig bestehender T1DM bekannt war. Einflüsse krankheitsassoziierter Prozesse sowie der Immunsystem-verjüngenden Wirkung, welche für Insulin beschrieben wurde⁷⁹, könnten hierbei eine Rolle spielen, scheinen jedoch in der von uns untersuchten Kohorte (noch) nicht nachweisbar zu sein.

5.2.2 Naive T-Zellen bei T1DM

Zur Bestimmung des Anteils naiver Zellen an der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellpopulation wurden sowohl CD45RA⁺CCR7⁺ Zellen untersucht als auch CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁺ und CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁻ Zellen. Dabei wiesen CD4⁺ Lymphozyten keine signifikanten Verschiebungen auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei CD8⁺ Lymphozyten eine Erhöhung aller drei Subpopulationen. Dies ist in Übereinstimmung mit eine kürzlich veröffentlichten Studie, welche für eine unserer T1DM LS-Gruppe vergleichbaren Kohorte ebenfalls eine Erhöhung des naiven Zellkompartiment – gemessen anhand der CD45RA⁺CCR7⁺CD28⁺CD27⁺ Zellen – innerhalb der CD8⁺ Zellpopulation beschrieb.¹²⁵

Um den Vergleich der Ergebnisse mit weiteren Studien zu ermöglichen, wurde zusätzlich die Expression von CD45RA auf CD8⁺ Lymphozyten unabhängig von CCR7 untersucht. Dabei ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede, jedoch wiederum eine Tendenz zur erhöhten Expression bei T1DM LS im Vergleich zu T1DM RO und zur Kontrollgruppe, während T1DM RO keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies.

In Zusammenschau mit drei weiteren Studien, von denen zwei bei neumanifestiertem Typ 1 Diabetes mellitus eine erhöhte^{114,115} und die dritte eine verminderte⁷⁹ CD45RA-Expression auf CD8⁺ Lymphozyten beschreiben, sprechen diese Daten für ein heterogenes Verhalten dieser Patientengruppe in

5 Diskussion

Bezug auf die CD45RA-Expression. Tatsächlich fanden Hedman et al. innerhalb der ersten Krankheitsmonate eine rapide Verminderung der Expression von CD45RA auf CD8⁺ Lymphozyten. Es ist denkbar, dass eine derartig schnelle Veränderung des Expressionsverhaltens zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen verschiedener Studien führt. So ist anzunehmen, dass sich Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aufgrund interindividueller Schwankungen der Krankheitsdynamik in unterschiedlichen Stadien befinden können und somit sehr unterschiedliche CD45RA-Expression aufweisen, obwohl sie sich in dem klinischen Kriterium „Krankheitsdauer“ nicht unterscheiden.

Im Gegensatz zu unseren Daten fanden Prelog et al. und Smerdon et al. jedoch übereinstimmend auch bei länger bestehendem Typ 1 Diabetes keinen Anstieg der Expression von CD45RA auf CD8⁺ Lymphozyten.^{79,114} Wenngleich für diesen Unterschied keine abschließende Erklärung gefunden werden konnte, fiel auf, dass in der Studie von Smerdon et al. die T1DM LS-Gruppe durch Erwachsene Probanden im Alter von durchschnittlich 46 Jahren vertreten wurde, was die Vergleichbarkeit zu unseren Daten einschränkt. Außerdem wiesen die beiden Kontrollgruppen der Studie von Smerdon et al. trotz eines erheblichen Altersunterschiedes kaum Veränderungen der CD45RA-Expression auf. Dies steht im Widerspruch zu Erkenntnissen über die Immunoseneszenz, denen zufolge die CD45RA-Expression im Alter deutlich abnehmen sollte, womit die Möglichkeit der Selektion einer zufälligerweise nicht-repräsentanten Kontrollgruppe für die T1DM LS-Gruppe zumindest in Betracht gezogen werden muss.

5.2.3 Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen bei T1DM

Passend zu der Erhöhung des Anteils naiver Zellen an der CD8⁺ Lymphozytenpopulation zeigten unsere Daten eine Verminderung des Anteils hochdifferenzierter Zellen (CD45RA⁺CCR7⁻CD28⁻) an der CD8⁺ Lymphozytenpopulation bei T1DM RO und T1DM LS gegenüber der Kontrollgruppe. Gleiches galt auch für die CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁻ Population innerhalb der CD8⁺ Lymphozyten, jedoch nur für T1DM LS gegenüber der Kontrollgruppe und auch weniger ausgeprägt als bei den CD45RA⁺CCR7⁻CD28⁻ Zellen. In der

5 Diskussion

Studie von Akesson et al. wurde ebenfalls eine Verminderung der CD45RA⁻CCR7⁻CD28⁻CD27⁻ Zellen innerhalb der CD8⁺ Lymphozytenpopulation bei T1DM festgestellt, jedoch nur für Patienten mit gleichzeitig bestehender Zöliakie.¹²⁵ Dennoch unterstützen diese Daten unsere Ergebnisse insofern, als dass sie auch als Zeichen einer Veranlagung von T1DM zur Verminderung dieser Zellpopulation angesehen werden können. Die Ausprägung dieser Verminderung könnte von der Intensität des Krankheitsverlaufes bzw. dem gleichzeitigen Auftreten assoziierter Autoimmunerkrankungen zusätzlich beeinflusst werden und sich somit bei Patienten mit gleichzeitiger Manifestation von T1DM und Zöliakie stärker äußern, als bei reinem T1DM ohne Begleitdiagnosen und auch stärker, als bei dem Patientenkollektiv in unserer Studie, welches sich aus T1DM mit und ohne assoziierten anderen Autoimmunerkrankungen zusammensetzt. Um diese Frage genauer zu untersuchen müssten jedoch größere Studienkohorten untersucht werden, um eine ausreichend große Fallzahl der einzelnen Probanden-Gruppierungen zu gewährleisten.

Wie auch schon bei naive Zellen konnten für CD4⁺ Lymphozyten auch bei differenzierten Zellpopulationen kaum Verteilungsverschiebungen bei T1DM im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Leichte Tendenzen zur Verminderung ergaben sich nur für CD28⁻ Subpopulationen, was die Beobachtung der geringgradig verminderten CD28-Expression auf CD4⁺ Zellen widerspiegelt. Aufgrund der geringen Ausprägung der Unterschiede bei gleichzeitig nur sehr wenigen gemessenen CD4⁺CD28⁻ Zellen sollten diese Verschiebungen jedoch zurückhaltend beurteilt werden. Unsere Daten geben somit für T1DM keinen Hinweis auf eine maßgebliche Veränderung des Differenzierungsverhaltens CD4⁺ Lymphozyten zu Gedächtnis- bzw. Effektorzellen. Dies steht wiederum in Einklang mit der Studie von Akesson et al.¹²⁵ Hier wurde lediglich für T1DM mit gleichzeitig bestehender Zöliakie eine Vermehrung der CD45RA⁺CCR7⁻CD28⁻CD27⁻ innerhalb der CD4⁺ Lymphozyten beschrieben, jedoch nicht bei reinem T1DM. Ebenso wurden keine Veränderungen anderer CD4⁺ Gedächtnis- bzw. Effektorpopulationen beschrieben.

Wir konnten somit zusammenfassend eine Mehrexpression von CCR7 auf CD8⁺ Zellen bei T1DM beschreiben, was sich vor allem zu einer quantitativen Zunahme der naiven Zellpopulation widerspiegelte. Relevante Unterschiede zwischen T1DM RO und T1DM LS bestanden nicht, sodass wir keinen Hinweis auf gesteigerte Immunoseneszenz im Krankheitsverlauf sehen, wobei einschränkend darauf verwiesen werden muss, dass vorwiegend pädiatrische Patienten untersucht wurden und somit die Krankheitsdauer in der von uns untersuchten Kohorte zu kurz sein könnte, um derartige Veränderungen zu sehen.

5.3 Veränderungen in CD4⁺ Effektorzellpopulationen bei T1DM

In unserer Studie wurden Oberflächenmerkmale und Zytokine von Th1-, Th2, Th17- und T_{reg}-Zellen untersucht. Zu den Th1-assoziierten Oberflächenmerkmalen zählen die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3. Obwohl sich eine Vielzahl von Studien mit CXCR3-Liganden – darunter vor allem IP-10 (CXCL10) – befasst hat¹³⁷, existieren nur wenige Studien zur Quantifizierung der Expression des Rezeptors bei Patienten mit T1DM. Dabei wurden in erster Linie CD4⁺ Zellen untersucht^{113,115,116,138-140}, wohingegen nur zwei dieser Studien die Rezeptorexpression auf CD8⁺ Zellen betrachtet haben^{113,115}. Eine genauere Unterteilung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen in Subpopulationen erfolgte nur in der Studie von Milicic et al.¹⁴⁰, in der spezifisch CD4⁺CD45RO⁺ Zellen betrachtet wurden.

In unserer Studie konnte kein signifikanter Unterschied der CXCR3-Expression auf CD4⁺ Zellen bzw. deren Subpopulationen bei T1DM RO oder T1DM LS im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden. Gleiches wurde auch in früheren Studien für länger bestehenden T1DM beschrieben.^{113,138,139} Im Gegensatz zu unseren Daten beschrieben jedoch einige frühere Studien eine signifikant niedrigere CXCR3-Expression auf CD4⁺ Zellen zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns.^{113,115,140} Die Studie von Lohmann et al. zeigte dabei einen Anstieg der CXCR3-Expression innerhalb weniger Monate nach

5 Diskussion

Krankheitsmanifestation, was sich in der Studie von Hedman et al. nicht bestätigte. Eine weitere Studie konnte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen auch für neu manifestierten T1DM die Verminderung der CXCR3-Expression auf CD4⁺ Zellen nicht bestätigen.¹¹⁶ Hierbei wurde sogar auf einigen CD4⁺ Gedächtniszellen eine erhöhte Expression von CXCR3 bei T1DM festgestellt und gleichzeitig eine verstärkte proinflammatorische Zytokinproduktion dieser Zellen auf T1DM-assoziierte Autoantigene beschrieben. Yamada et al. konnten in ihrer Studie ebenfalls zuerst keine Veränderung der CXCR3-Expression auf CD4⁺ Zellen bei T1DM feststellen, beschrieben jedoch signifikante Unterschiede bei Unterteilung der T1DM-Kohorte hinsichtlich unterschiedlicher klinischer Verlaufsformen.¹³⁹ So exprimierte T1DM mit fulminantem Krankheitsverlauf signifikant weniger CXCR3 als T1DM mit normalem Krankheitsverlauf und Kontrollen, während T1DM mit normalem Krankheitsverlauf signifikant höhere CXCR3-Expression als Kontrollen zeigte. In Zusammenschau mit den Ergebnisse von Yamada et al. könnte somit die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse in verschiedenen Studien eine unterschiedliche Zusammensetzung der Studienkohorten sein. Demnach kann trotz einiger Hinweise auf veränderte CXCR3-Expression auf CD4⁺ Zellen nach unseren Ergebnissen und denen früherer Studien nicht pauschal von einer Über- oder Unterexpression des Chemokinrezeptors auf CD4⁺ Zellen ausgegangen werden.

Auch für den Th1-assoziierten Chemokinrezeptor CCR5 ist die bisherige Datenlage für T1DM nicht eindeutig. Auch hier wurde für CD4⁺ Zellen sowohl eine verminderte^{113,115,116} als auch eine unveränderte bzw. tendenziell erhöhte Expression¹³⁹ beschrieben. Obwohl manche Studien eine Verminderung der CCR5-Expression bzw. eine Blockade des Rezeptors mit einem Schutz vor T1DM in Zusammenhang bringen, konnten genetische Studien keine eindeutigen Verbindung von CCR5-Deletionen mit geänderter T1DM-Frequenz nachweisen.¹⁴¹ Unsere Daten zeigen keine Veränderung der CCR5-Expression auf CD4⁺ Zellen bei T1DM, was in Anbetracht der unveränderten CXCR3-Expression ein stimmiges Bild ergibt.

5 Diskussion

CCR6 stellt den dritten in unserer Studie untersuchten mit proinflammatorischen T-Zellen assoziierten Chemokinrezeptor dar und wird besonders mit Th17-Zellen in Zusammenhang gebracht. Obwohl sich eine Vielzahl von Studien bereits der Charakterisierung dieser Zellen und deren Funktion bzw. Bedeutung bei T1DM gewidmet hat, ist unsere Studie nach unserem Wissen die erste, welche den Anteil CCR6-exprimierender Zellen im peripheren Blut zwischen T1DM und Kontrollen vergleicht. Hierbei lag im Gegensatz zu den Ergebnissen für CCR5 und CXCR3 eine signifikant erhöhte CCR6-Expression auf CD4⁺CD45RA⁻ Zellen vor. Dies galt insbesondere für CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺ Zellen und zeigte sich etwas deutlicher auf Zellen von T1DM mit länger bestehender Erkrankung, war jedoch auch bei T1DM RO als deutliche Tendenz erkennbar. Die Betrachtung der Kombination von CCR6 mit andere Oberflächenmolekülen ergab weiterhin trotz unveränderten Gesamtanteils CD161-exprimierender Zellen an der CD4⁺ Population eine trendmäßig erhöhte Koexpression von CCR6 und CD161 auf CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺ Zellen. Wiederum betraf die Veränderung gleichermaßen T1DM RO und T1DM LS. Außerdem war die Koexpression von CCR6 und CCR5 bei T1DM LS, jedoch nicht bei T1DM RO, signifikant erhöht. Gleiches beschrieben auch Ferraro et al. in Lymphknoten von T1DM, welche zum Zeitpunkt der Entnahme eine Pankreas- bzw. Nierentransplantation erhielten, also vermutlich ebenfalls eine mehrjährige Krankheitsgeschichte aufwiesen. In unserer Studie wies der Oberflächen-Phänotyp der Zellen von Typ 1-Diabetikern somit eine Verschiebung des Expressionsmusters hin zu einer Betonung Th17-assoziiertes Merkmale auf.

Um die Funktion der untersuchten PBMC genauer beleuchten zu können, wurden die Zellen unspezifisch mit PMA und Ionomycin stimuliert und anschließend die Expression der proinflammatorischen Effektorzytokine IFN γ und IL-17 sowie der Typ 2- bzw. regulatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 untersucht. Eine Vielzahl früherer Studie hat bereits Zytokine IFN γ und IL-4 im Serum oder nach *in vitro*-Stimulation charakterisiert, jedoch mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. So beschrieben mehrere Studien vor allem bei

5 Diskussion

T1DM RO, aber auch bei T1DM LS, verminderte IFN γ -Antwort bei T1DM^{113,117,118,142,143}, während andere keine Veränderung^{138,144-147} oder sogar verstärkte Antwort¹⁴⁸⁻¹⁵⁴ beschrieben. Lediglich für die IL-4-Antwort konnte in weitestgehender Übereinstimmung keine Veränderung bei T1DM festgestellt werden^{117,138,143,144,149-152} und es fanden nur einzelne Studien Anzeichen einer Verminderung^{113,116,118}. Unabhängig von den Ergebnissen der einzelnen Zytokine wird jedoch sehr einheitlich davon ausgegangen, dass es bei T1DM zu einem relativen Überwiegen der Typ 1-Zytokine gegenüber der Typ 2-Zytokine kommt. Entsprechend der späteren Entdeckung der Th17-Zellen liegen weniger Studien zur Expression von IL-17 bei T1DM vor. Diese beschrieben oft eine verstärkte IL-17-Antwort, was jedoch in der Studie von Ferraro et al. nur in Lymphknoten vorlag, während im peripheren Blut kein signifikanter Unterschied nachweisbar war.^{147,152-155} Überraschenderweise zeigte sich in unserer Studie trotz der beschriebenen erhöhten Expression Th17-typischer Marker keine Veränderung der IL-17-Produktion bei T1DM. Gleichzeitig war jedoch die IFN γ -Expression signifikant erhöht, was wiederum im Kontrast zur unveränderten Expression der Th1-assoziierten Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 stand. Für IL-4 konnte in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen ein statistischer Trend zur verminderten Expression bei T1DM festgestellt werden, was jedoch nie Signifikanzniveau erreichte und somit als nicht maßgeblich erachtet wurde. Insgesamt konnte somit eine Neigung zur proinflammatorischen Antwort bei T1DM festgestellt werden, was den Vorergebnissen entspricht. Da in unserer Studie im Gegensatz zu den meisten früheren Studien die Zytokinexpression nicht im Kulturüberstand bzw. Serum sondern auf zellulärer Ebene bestimmt wurde, konnten wir außerdem feststellen, dass die erhöhte IFN γ -Expression am deutlichsten in der CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺ Population festzustellen war. Auch die erhöhte Expression von CCR6 und CD161 war auf CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD28⁺ Zellen, also in der mutmaßlich selben Population gemessen worden. Es kann somit spekuliert werden, dass es sich bei der IFN γ -überexprimierenden Population um Zellen handelte, welche Th17-typische Oberflächenmarker exprimierten. Studien am Mausmodell haben Hinweise darauf geliefert, dass Th17-Zellen zwar eine bedeutende pathogene

5 Diskussion

Rolle für den T1DM spielen, jedoch für die Manifestation der Erkrankung eine Differenzierung zu IFN γ -produzierenden Zellen nötig ist.^{105,106} Diese werden dann als Th17/Th1-Zellen (IL-17⁺IFN γ ⁺) bzw. als nicht-klassische Th1-Zellen (IL-17⁻IFN γ ⁺) bezeichnet. Th17/Th1-Zellen bzw. nicht-klassischen Th1-Zellen wird demzufolge eine große Bedeutung in der Entwicklung eines T1DM zugesprochen. Während eine proapoptotische Wirkung von IFN γ auf β -Zellen des Pankreas schon früher beschrieben wurde, konnte in einer Studie von 2011 gezeigt werden, dass IL-17 diese Wirkung verstärken kann, was die Bedeutung von IFN γ und IL-17 koexprimierender Zellen zusätzlich betont.¹⁵⁴ Es wurde außerdem gezeigt, dass nicht-klassische Th1-Zellen durch die Expression der ursprünglich auf Th17-Zellen beschriebenen Marker CCR6 und CD161 charakterisiert werden können.¹⁵⁶ Dies unterstützt unsere Hypothese, dass die von uns beobachtete erhöhte Expression von CCR6, CD161 und IFN γ jeweils auf dieselbe Zellpopulation zurückzuführen ist. Zur Bestätigung dieser Vermutung wäre allerdings eine weitere Studie mit Färbung dieser Proteine im selben Versuchsansatz nötig.

Eine weitere wichtige CD4⁺ Zellpopulation stellen T_{reg} dar. Obwohl Th17/Th1-Zellen bzw. nicht-klassische Th1-Zellen mit T1DM in Verbindung gebracht werden, ist bisher kaum etwas darüber bekannt, warum es zu einer Vermehrung dieser Zellpopulation kommt. Es wird jedoch vermutet, dass ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Effektorzellen und regulatorischen Zellen zugrunde liegen könnte. Unsere Daten zeigen keinen absoluten quantitativen Mangel an T_{reg} auf. Im Gegenteil zeigte sich sogar ein vermehrtes Vorkommen dieser Zellpopulation bei T1DM LS, was sich auch schon bei T1DM RO abzuzeichnen scheint. Dies bestätigt vorrausgegangene Studien, welche ebenfalls keinen T_{reg}-Mangel bei T1DM finden konnten, bzw. teilweise auch einen T_{reg}-Überschuss beschrieben.^{136,147,152,153,157-159} Dennoch deuten einige Studienergebnisse darauf hin, dass T_{reg} bei T1DM schwächer supprimierend auf Effektorzellen einwirken, als bei Gesunden. Dies scheint jedoch nicht an einer verminderten Funktion der T_{reg}-Population zu liegen, sondern vielmehr an einer ungewöhnlich hohen Resistenz der Effektorzellen gegenüber

5 Diskussion

regulatorischen Signalen.³⁶ Wenngleich wir unter anderem aufgrund der zu geringen Produktion von IL-10 keine sicheren Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit der T_{reg} ziehen können, sind unsere Beobachtungen einer erhöhten Effektorzellzahl trotz erhöhter T_{reg}-Zahl gut mit einer derartigen Resistenz der Effektorzellen vereinbar.

Zusammenfassend konnten wir für einzelne CD4⁺ Subpopulationen, insbesondere CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺ Zellen, auf zellulärer Ebene die schon in früheren Studien beschriebene Überexpression von IFN γ bestätigen und unsere Ergebnisse deuten gleichzeitig darauf hin, dass es sich hierbei um nicht-klassische Th1-Zellen handeln könnte, denen im Laufe der letzten Jahre große pathogenetische Bedeutung für den T1DM zugesprochen wurde. Da hiermit eine Verbindung der Expression von CCR6 zur möglicherweise pathogenen IFN γ -Produktion geschaffen wird, zeigt sich eine Blockade CCR6-vermittelter Zellmigration als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse, dass eine CCR7-vermittelte Migration dieser Zellen ebenfalls möglich wäre, da sich die erhöhte IFN γ -Produktion auch in CCR7⁺ Zellen deutlich zeigt. Einen quantitativen T_{reg}-Mangel konnten wir in der von uns untersuchten Kohorte als Ursache der gesteigerten nicht-klassischen Th1-Antwort ausschließen, es könnte allerdings dennoch ein Ungleichgewicht T_{reg}-vermittelter Signale und entsprechender Resistenzmechanismen der Zielzellen vorliegen.

5.4 Veränderungen in CD8⁺ Effektorzellpopulationen bei T1DM

Analog zu CD4⁺ Zellen wurden auch für CD8⁺ Zellen proinflammatorische Oberflächenmerkmale und Zytokine untersucht. Im Vergleich zu CD4⁺ Zellen liegen für CD8⁺ Zellen weitaus weniger Ergebnisse aus früheren Studien vor, da im Allgemeinen die T1DM-Forschung an CD8⁺ Zellen weniger intensiv betrieben wird. Die Interpretation unsere Ergebnisse im Zusammenhang mit Vorergebnissen ist entsprechend schwieriger. Es ist jedoch möglicherweise von

5 Diskussion

großer Bedeutung, auch diese Zellpopulation ausführlich zu analysieren, da mit dem derzeitigen Kenntnisstand keineswegs davon ausgegangen werden kann, dass sich pathogenetisch relevante Veränderungen auf die CD4⁺ Zellpopulation beschränken.

Analog zur CD4⁺CD45RA⁻ Zellpopulation konnte in unserer Studie auch für CD8⁺CD45RA⁻ Zellen eine Überexpression von CCR6 bei T1DM festgestellt werden, was eine mögliche Bedeutung dieses Chemokinrezeptors nochmals hervorhebt. Anders als bei CD4⁺ Zellen wiesen CD8⁺ Zellen jedoch auch deutliche Verschiebungen der Expression von CXCR3 und CCR5 auf. Hierbei lag sowohl für T1DM RO, als auch für T1DM LS eine maßgebliche Überexpression von CXCR3 auf CD8⁺CCR7⁺ Populationen vor, während CD8⁺CCR7⁻ Populationen nie signifikante Verschiebungen zeigten. Eine derartige Veränderung der CXCR3-Expression konnte zwar in zwei früheren Studien im peripheren Blut nicht beobachtet werden^{113,115}, allerdings wurde kürzlich im Mausmodell intrapankreatische CXCR3-Überexpression auf CD8⁺ Zellen beschrieben.¹⁶⁰ In Anbetracht der im peripheren Blut beschriebenen Heterogenität der CXCR3-Expression auf CD4⁺ Zellen bei T1DM (siehe Kapitel 5.3), scheint auch eine entsprechende Heterogenität innerhalb der CD8⁺ Population plausibel. Die Expression von CCR5 auf CD8⁺CD45RA⁺ Zellen war bei T1DM deutlich reduziert.

Die gegensätzliche Regulierung von CXCR3 und CCR5 erscheint an dieser Stelle zuerst seltsam, da beide Chemokinrezeptoren oft mit proinflammatorischen Zytokinen und Migration in proinflammatorisches Gewebe in Zusammenhang gebracht werden. Allerdings basieren diese Erkenntnisse in erster Linie auf Untersuchungen an CD4⁺ Zellen. Im auffälligen Kontrast hierzu zeigte eine neuere Studie von Shi et al., dass CD8⁺CXCR3⁺ Zellen regulatorische Funktionen besitzen und die IFN γ -Produktion von CD8⁺CXCR3⁻ Zellen supprimieren.¹⁶¹ Dies verdeutlicht, wie wichtig die differenzierte Betrachtung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen ist. Gut vereinbar mit den Beobachtungen von Shi et al. konnte in unserer Studie für CD8⁺ Zellen trotz erhöhter CXCR3-Expression kein Anstieg der IFN γ -Expression bei T1DM beobachtet werden, womit davon

5 Diskussion

auszugehen ist, dass es sich nicht um IFN γ -produzierende CD8⁺CXCR3⁺ Zellen handelte, sondern eher um andere – eventuell regulatorische – Zellen.

Die Blockade von CXCR3-vermittelter Migration wurde in zwei Studien aus den Jahren 2002 und 2003 mit maßgeblichen T1DM-protektiven Wirkungen in Zusammenhang gebracht, was das Interesse an Studien in diese Richtung weckte und auch für uns Anlass zur Untersuchung der CXCR3-Expression gab.^{162,163}

Spätere Studien wiederum lieferten eher kontroverse Ergebnisse, da sie die funktionelle Bedeutung CXCR3-vermittelter Migration für die Infiltration des Pankreas im Rahmen eines T1DM eher anzweifeln.^{164,165} Während der Durchführung unserer Studie publizierten Coppieters et al. schließlich Daten, welche die Rolle von CXCR3 bei T1DM ausführlich reevaluierten und dabei keinen Anhalt auf eine Bedeutung dieses Chemokinrezeptors für die T-Zell-Infiltration in das Pankreas gaben.¹⁶⁰ Zwar widerlegen diese Daten nicht die grundsätzliche Möglichkeit, dass CXCR3-vermittelte Infiltration auftreten könnte, zeigen jedoch, dass eine spezifische Blockade der CXCR3-Achse nicht zur Verminderung der Infiltration führt, möglicherweise aufgrund von Redundanz verschiedener Migrationsmechanismen untereinander.

Diese neuen Erkenntnisse lassen daher vermuten, dass die in unserer Studie beobachtete CXCR3-Überexpression für sich genommen nur von geringer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieansätze (im Sinne einer CXCR3-Blockade) ist. Sie liefern jedoch in Verbindung mit den Ergebnissen von Shi et al. Hinweise darauf, dass es sich um regulatorische Zellen handeln könnte, was ihre Rolle in der Pathogenese des T1DM in ein anderes Licht stellt als zuvor. Außerdem ist zu beachten, dass Shi et al. die von ihnen beschriebenen regulatorischen CD8⁺ Zellen in erster Linie im CD45RA⁻CCR7⁺ Kompartiment fanden und auch wir die CXCR3-Überexpression in erster Linie auf CCR7⁺ Zellen beschreiben. Dadurch ist davon auszugehen, dass diese (regulatorischen) CD8⁺ Zellen zur CCR7-vermittelten Migration fähig sind, was auch für die Infiltration des Pankreas von Bedeutung sein könnte. Interessanterweise fanden Shan et al. im Mausmodell des T1DM eine intrapankreatische Expression von CCR7-mRNA bei erkrankten, jedoch nicht bei gesunden Tieren. Suppression CCR7-vermittelter Migration konnte die T-

5 Diskussion

Zell-Infiltration maßgeblich vermindern.¹⁶⁶ Zusammenfassend kann somit die Hypothese aufgestellt werden, dass CXCR3-exprimierende CD8⁺ Zellen eine pathogenetische Rolle bei T1DM spielen und die Widersprüche der Daten früherer Studien bezüglich des Effektes einer CXCR3-Blockade auf den Krankheitsverlauf darauf zurückzuführen sind, dass diese Zellen nicht (oder nicht ausschließlich) auf CXCR3-vermittelte Migration angewiesen sind, da sie auch CCR7 exprimieren.

Eine genauere Charakterisierung CXCR3-exprimierender CD8⁺ Zellen bei T1DM könnte somit wichtige neue Erkenntnisse zu pathogenen Prozessen liefern. Insbesondere wäre eine Untersuchung der regulatorischen Funktion bei T1DM im Vergleich zu gesunden Probanden sehr interessant, um feststellen zu können, ob den regulatorischen Signalen dieser CD8⁺CXCR3⁺ Zellen wiederum eine Resistenz der Zielzellen gegenübersteht, wie dies auch schon für CD4⁺ T_{reg} beschrieben wurde. Außerdem wäre die Untersuchung CCR7-vermittelter Migration der CD8⁺CXCR3⁺ Zellen sehr interessant. Es sollte allerdings beachtet werden, dass bei der Suche nach potenziellen Therapieansätzen die Untersuchung CCR6-vermittelter Migration möglicherweise schneller zielführend ist, da diese unseren Daten zufolge die Migration proinflammatorischer Zellen an den Ort der Entzündung behindern könnte, während eine CCR7-Blockade unseren Überlegungen zufolge regulatorische Zellen vom Ort der Entzündung fernhalten würde und somit kontraproduktiv sein könnte.

5.5 Veränderungen der TNF α -Produktion

Das proinflammatorische Zytokin TNF α soll an dieser Stelle gesondert diskutiert werden, da es im Gegensatz zu dem ebenfalls proinflammatorischen Zytokin IFN γ hauptsächlich von Makrophagen produziert wird³, was für die Interpretation unserer Ergebnisse von Bedeutung ist.

Viele Studien beschreiben eine Mehrproduktion von TNF α bei Patienten mit T1DM.^{143,144,148,149} Im Gegensatz dazu finden sich nur einzelne Berichte über verminderte TNF α -Produktion bei Patienten mit T1DM und diese beziehen sich dabei ausschließlich auf T1DM RO.^{113,146} Überraschenderweise zeigen unsere

5 Diskussion

Ergebnisse eine Minderproduktion von TNF α in CD8⁺ Zellen bzw. den entsprechenden Subpopulationen bei Patienten mit T1DM unabhängig von der Krankheitsdauer, wobei die statistischen Tests nur vereinzelt Signifikanzniveau erreichen, jedoch fast immer einen Trend bestätigen. Für CD4⁺ Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen beobachtet werden.

Diese Ergebnisse passen in das Gesamtbild unserer Beobachtungen. Einerseits zeigen CD4⁺ Zellen auch nur in einzelnen Subpopulationen veränderte IFN γ -Produktion, sodass eine dramatische Änderung der TNF α -Produktion eher unerwartet wäre. Andererseits konnte für CD8⁺ Zellen ein am ehesten als regulatorischer Phänotyp zu interpretierendes Differenzierungsmuster beschrieben werden, sodass eine niedrigere TNF α -Produktion der Subpopulationen zu erwarten ist – entweder da die Zellen selbst regulatorische Funktion haben und somit eher kein TNF α produzieren oder weil die TNF α -Produktion durch regulatorische Zellen supprimiert wird.

Auf den ersten Blick ist jedoch unklar, warum viele frühere Studien ein scheinbar widersprüchliches Ergebnis liefern. Eine naheliegende Erklärung hierfür besteht darin, dass in diesen Studien die TNF α -Menge im Serum oder Zellüberstand gemessen wurde, womit auch die Produktionskapazität der Makrophagen einfließt, während die Produktionskapazität durch Lymphozyten eher in den Hintergrund tritt. In unsere Studie konnte somit gezeigt werden, dass bei der Forschung an TNF α im Zusammenhang mit T1DM Augenmerk auf die Unterscheidung zwischen Produktion durch Lymphozyten oder durch Makrophagen gelegt werden sollte. Unterstützend für diese Theorie beschrieben Hussain et al. eine erhöhte TNF α -Produktion bei T1DM nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (einem effektiven Stimulans für Monozyten), jedoch nicht nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (einem Stimulans für Lymphozyten) und auch nicht bei Messung ohne vorherige Stimulation.

5.6 Limitationen und mögliche Fehlerquellen

Für jede wissenschaftliche Studie ist die Beachtung der Limitationen oder auch potenzieller Fehlerquellen – deren Vorliegen prinzipiell nie ausgeschlossen wer-

5 Diskussion

den kann – essenziell, um die Ergebnisse in das Gesamtbild des aktuellen Forschungsstandes einordnen zu können. Hier soll auf die relevantesten Limitationen oder Fehlerquellen der hier vorliegenden Studie eingegangen werden.

5.6.1 Limitationen durch die Probandenselektion

In der hier vorliegenden Studie ist unter anderem auf die eher kleine Stichprobengröße hinzuweisen. Die nochmalige Bestätigung unserer Ergebnisse anhand einer anderen Studienkohorte wäre gut, um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass die Ergebnisse auf einer zufälligerweise nicht repräsentativen Stichprobe beruhen. Es ist jedoch auch zu bedenken, dass Veränderungen, welche bereits bei einer kleinen Stichprobengröße Signifikanzniveau erreichen, eine höhere Chance haben, klinisch relevant zu sein, da sie offensichtlich stärker ausgeprägt sind als Veränderungen, welche erst bei sehr großen Stichproben überhaupt statistisch signifikant werden. Eine statistische Power-Kalkulation für die vorliegende Studie wurde anhand von Daten aus Vorstudien⁷⁹ durchgeführt und ergab für den Parameter „% naiver T-Zellen“ eine geeignete Fallzahl. Obwohl diese für die Subgruppen T1DM RO und T1DM LS unterschritten wurde, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen, was das Vorliegen dieser Unterschiede nochmals bestärkt.

Eine weitere Limitation der hier vorliegenden Studie besteht in der Beschränkung auf Patienten im Alter bis zu maximal 21 Jahren. Hierdurch ergibt sich ein sehr geringes Spektrum an Patientenalter und an Krankheitsdauer, wodurch möglicherweise Effekte eines langjährig bestehenden T1DM nicht erkannt werden können. Dementsprechend wären Studien, welche sowohl pädiatrische als auch erwachsene Patienten untersuchen, interessant.

Es ist außerdem zu beachten, dass T1DM RO eine andere Geschlechterzusammensetzung aufwies als T1DM LS oder die Kontrollgruppe, während die Zusammensetzung der letzteren beiden Gruppen etwa übereinstimmte. Es ist somit möglich, dass Veränderungen in der T1DM RO-Gruppe auf das Überwiegen weiblicher Probanden und nicht auf die Krankheit zurückzuführen sind. Da wir jedoch kaum Unterschiede zwischen T1DM LS und

5 Diskussion

T1DM RO gefunden haben, jedoch mehrere Veränderungen beim Vergleich zur Kontrollgruppe, erscheint ein derartiger Fehler unwahrscheinlich.

5.6.2 Limitationen durch das Probenmaterial

T1DM ist eine Krankheit, welche sich spezifisch in den Langerhans-Inseln des Pankreas abspielt. Somit stellen Gewebeproben des Pankreas das vermutlich idealste Probenmaterial dar. Da es jedoch für Studien am humanen T1DM praktisch fast unmöglich ist, dieses Material in ausreichenden Mengen zu erlangen, muss auf andere Probenmaterialien zurückgegriffen werden. Hierzu zählt in erster Linie peripheres Blut, welches auch in der hier vorliegenden Studie verwendet wurde. Man darf allerdings nicht vergessen, dass Untersuchungsergebnisse aus peripherem Blut möglicherweise die Verhältnisse am Ort der Entzündung nicht korrekt widerspiegeln, was jedoch eine derzeit nicht zu umgehende Einschränkung darstellt.

5.6.3 Limitationen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt derzeit eine der besten Möglichkeiten dar, Veränderungen auf Einzelzellebene untersuchen zu können und bietet gleichzeitig die Möglichkeit, mehrere Charakterisierungen mithilfe der immer steigenden Anzahl gleichzeitig einsetzbarer Fluorochrome synchron durchführen zu können. Die Mehrkanal-Durchflusszytometrie bringt jedoch auch technische Schwierigkeiten mit sich, welche derzeit nicht vollkommen gelöst sind. Hierzu zählen die Interferenz der Signale untereinander und die derzeit noch sehr subjektive Festlegung der Abgrenzung einer ungefärbten von einer gefärbten Population (Cutoff) bei der Auswertung der Messdaten. Außerdem ist anzunehmen, dass nicht alle Zellen einer Population (z.B. naive Zellen) einen bestimmten Marker (z.B. CD45RA) in gleicher Intensität exprimieren, sondern hierbei wird vermutlich ein Spektrum vorliegen. Dies führt bei der Anwendung fester Cutoffs – was derzeit eine weitverbreitete Praktik ist – dazu, dass ein gewisser Prozentsatz der Zellen falsch zugeordnet wird. Dies führt am ehesten dazu, dass infolge des entstehenden stochastischen Messfehlers eine größere Streubreite der Daten resultiert, womit gering ausgeprägte Veränderungen mit höherer Wahrscheinlichkeit verkannt bzw. erst bei großer Stichprobengröße erkannt werden. Aufgrund der wachsenden Bedeutung der

5 Diskussion

Durchflusszytometrie wird derzeit versucht, Interpretationsverfahren zu entwickeln, welche das Problem der subjektiven Datenauswertung und die Limitationen der Cutoff-Anwendung umgehen sollen (z.B. *probability state modeling*).¹⁶⁷ Diese konnten jedoch für unsere Daten noch nicht eingesetzt werden.

5.7 Zusammenfassung

In der aktuellen Studie konnten zusammenfassend die in Tabelle 5.1 aufgezeigten Unterschiede zwischen T1DM und Kontrolle aufgezeigt werden.

Es zeigte sich einerseits eine deutliche Mehrexpression Th17-assoziiierter Oberflächenmarker auf CD4⁺ Zellen bei T1DM. Dies war begleitet von einer erhöhten IFN γ -Expression, jedoch ohne Hinweis auf eine Überexpression von IL-17. Da bereits in früheren Studien vor allem eine pathogenetische Bedeutung nicht-klassischer Th1-Zellen (IFN γ +IL17⁻) diskutiert wird^{105,106}, kann angenommen werden, dass diese Beobachtung auf ein vermehrtes Vorkommen nicht-klassischer Th1-Zellen zurückzuführen ist.

Zum anderen wurde eine deutlich erhöhte CXCR3-Expression auf CD8⁺ Zellen bei T1DM beobachtet, welche jedoch nicht von einer Mehrexpression von IFN γ oder TNF α begleitet war, sondern im Gegenteil von einer eher reduzierten TNF α -Expression. CD8⁺CXCR3⁺ Zellen wurde in früheren Studien eine Rolle als regulatorische Zellen zugesprochen¹⁶¹, was mit den hier bemachten Beobachtungen gut vereinbar ist. Zudem konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass die vermehrt vorkommenden CD8⁺CXCR3⁺ den Chemokinrezeptor CCR7 – welcher ebenfalls bei T1DM auf CD8⁺ Zellen überexprimiert wurde - tragen und somit potenziell zur CCR7-vermittelten Migration befähigt sind. Dieser Zusammenhang von CXCR3 und CCR7 wäre ein Erklärungsansatz, warum CXCR3-Blockade in früheren Studien keinen überzeugenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf hatte, obwohl zuvor eine CXCR3-Überexpression bei T1DM beobachtet worden war^{160,165}.

Da bis dato kein kausaler Therapieansatz für T1DM etabliert werden konnte, ist die Suche hiernach ein intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet. In Anbetracht der aufkommenden Bedeutung spezifischer Zellmigrations-beeinflussender

5 Diskussion

Antikörper bei der Therapie anderer Autoimmunerkrankungen ist die Untersuchung Chemokin-vermittelter Migration bei T1DM ein naheliegender Ansatzpunkt hierfür. Die in der aktuellen Studie beschriebenen prozentualen Veränderungen der Chemokinrezeptor-positiven T-Zellen lassen vermuten, dass CCR6- bzw. CCR7-vermittelte Migration eine wichtige Rolle in der Pathogenese des T1DM spielen könnte. Eine genauere Beleuchtung dieser Rezeptoren und die Untersuchung des therapeutischen Effektes einer entsprechenden Migrationsblockade durch spezifische CCR6- bzw. CCR7-Antikörper erscheinen somit als ein vielversprechender Ansatz für zukünftige Studien.

5 Diskussion

Tabelle 5.1 Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse

Population [Gate]	T1DM RO vs. KG	T1DM LS vs. KG	T1DM RO vs. T1DM LS
CCR6 ⁺ [CD4 ⁺ CD45RA ⁻]	↑	↑	↔
CCR5 ⁺ CCR6 ⁺ [CD4 ⁺ CD45RA ⁻]	↔	↑	↔
IFN γ ⁺ [CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺]	↑	↑	↔
IL-17 ⁺ [CD4 ⁺ CCR6 ⁺]	↔	↔	↔
CCR7 ⁺ [CD8 ⁺]	↔	↑	↔
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ [CD8 ⁺]	↔	↑	↔
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ [CD8 ⁺]	↑	↔	↔
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁻ [CD8 ⁺]	↑	↔	↑
CXCR3 ⁺ [CD8 ⁺ CCR7 ⁺]	↑	↑	↔
CXCR3 ⁺ [CD8 ⁺ CCR7 ⁻]	↔	↔	↔
CXCR3 ⁺ [CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺]	↑	↑	↔
CXCR3 ⁺ [CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁻]	↑	↑	↔
CXCR3 ⁺ [CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CD28 ⁺]	↔	↑	↔
TNF α ⁺ [CD8 ⁺]	↓	↓	↔

Die Tabelle zeigt eine Auswahl der relevantesten Ergebnisse. Schwarze Pfeile geben signifikante Veränderungen an, während graue Pfeile Trends angeben. Die Pfeilrichtung beschreibt dabei eine Hinaufregulation bzw. eine Herunterregulation der Expression der untersuchten Marker als prozentuellen Anteil an der Population in eckiger Klammer. Horizontale Pfeile zeigen Werte an, bei denen kein Unterschied zwischen den Probandengruppen gefunden wurde.

6 Zusammenfassung

Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) ist eine Autoimmunerkrankung, welche durch die progrediente Schädigung der β -Zellen der Pankreas mit dadurch resultierendem absolutem Insulinmangel gekennzeichnet ist. Obwohl sich eine Vielzahl an Studien in den vergangenen Jahrzehnten den zellulären Grundlagen dieser Erkrankung gewidmet hat, fehlt bis dato ein geeigneter kausaler Therapieansatz, sodass nach wie vor lediglich die eher symptomatisch orientierte Insulin-Substitution im Vordergrund steht.

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der genauen Charakterisierung von Immunzellen – insbesondere Lymphozyten – aus dem peripheren Blut erkrankter Kinder mit dem Ziel, Verschiebungen im Phänotyp dieser Zellen aufzudecken, um potenzielle Ansatzpunkte zur weiteren Forschung und Therapiefindung zu finden. Hierfür wurde die Durchflusszytometrie genutzt, um den genauen Phänotyp der Lymphozyten zu untersuchen und Veränderungen im Oberflächenmarker-Expressionsmuster einzelner spezifischer Subpopulationen zuweisen zu können.

In erster Linie wurden hierbei zwei Zellpopulationen identifiziert, welche bei erkrankten Kindern deutlich vermehrt im peripheren Blut vorkommen, als bei gesunden Vergleichspersonen.

Die Erste dieser Populationen sind CCR6-exprimierende CD4⁺ Zellen. Dies ist interessant, da CCR6 in verschiedenen früheren Studien mit Autoimmunität in Verbindung gebracht wurde. In der weiteren Analyse zeigte sich, dass eine erhöhte IFN γ -Produktion in der vermutlich selben Zellpopulation vorlag, die auch CCR6 verstärkt exprimierte (Gedächtnis-T-Zellen vom Typ CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺), während kein Anhalt auf eine geänderte IL-17-Produktion gesehen werden konnte.

Die zweite in unserer Studie bei T1DM deutlich vermehrte Zellpopulation sind CXCR3-exprimierende CD8⁺ Zellen. Hierbei handelte es sich in erster Linie um Zellen, welche auch CCR7 exprimierten.

In der hier vorliegenden Studie wurde die T1DM-Gruppe außerdem aufgeteilt nach der Krankheitsdauer (recent onset T1DM RO und long-standing

6 Zusammenfassung

T1DM LS), um im Krankheitsverlauf entstehende Veränderungen erkennen zu können. Es konnten jedoch insgesamt keine klaren derartigen Veränderungen festgestellt werden, was allerdings möglicherweise auch an einer zu geringen überblickten Zeitspanne liegen könnte (geringe durchschnittliche und maximale Krankheitsdauer).

Aufgrund unserer Ergebnisse kann spekuliert werden, dass es sich bei den prozentuell vermehrt auftretenden CCR6⁺ Zellen um IFN γ -produzierende Zellen handelt. Dies würde neueren Erkenntnissen von anderen Studien entsprechen, welche nicht – wie zuvor vermutet wurde – Th17-Zellen, sondern nicht-klassische Th1-Zellen als pathogene Population diskutieren. Ein quantitativer Mangel an T_{reg} als Ursache der gesteigerten IFN γ -Produktion erscheint nach unseren Ergebnissen unwahrscheinlich, da wir erhöhte Mengen CD25⁺CD127^{-dim} Zellen bei T1DM nachweisen konnten.

Die beobachtete Koexpression von CXCR3 und CCR7 ist interessant vor dem Hintergrund, dass CXCR3-Überexpression im Pankreas in einer früheren Studie mit T1DM in Verbindung gebracht wurde, jedoch eine CXCR3-Blockade bisher keinen geeigneten therapeutischen Ansatz lieferte. Zunächst kann hier aber nur eine Assoziation beschrieben werden, wobei ein kausaler Zusammenhang in geeigneten Studiendesigns überprüft werden müsste.

Eine genauere Betrachtung der CD8⁺CCR7⁺CXCR3⁺ Zellen könnte nach unserer Ansicht interessante neue Aspekte und potenzielle Therapieansätze offenlegen. Insbesondere scheint die Untersuchung CCR7-vermittelter Migration dieser Zellen einen geeigneten Studienansatz darzustellen. Ebenso verweisen unsere Ergebnisse erneut auf eine pathogene Rolle CCR6-exprimierender Zellen, welche in kommenden Studien näher beleuchtet werden sollte.

6 Zusammenfassung

Abstract

T1DM displays an autoimmune disease characterized by a progressive destruction of pancreatic β cells, with subsequent absolute lack of Insulin. Despite a high number of studies dedicated to the investigation of the cellular background of the disease throughout the last decades, still no appropriate causal therapy exists, thus leaving the symptomatic approach of Insulin substitution the main therapeutic approach.

This study focused on a more precise characterization of immune cells – especially lymphocytes – derived from peripheral blood of children with T1DM, with the aim of uncovering phenotypical changes in these cells and potentially revealing new therapeutic targets. Flow cytometry was used in order to define cell phenotype more accurately and allocate changes in the expression profile of cell surface markers of lymphocyte subpopulations more specifically than in early studies.

Two cell populations were significantly increased in the peripheral blood of diseased children compared to healthy controls.

First, CCR6-expressing CD4⁺ cells were increased, which is of interest considering earlier studies that showed a connection of this chemokine receptor to autoimmunity. Furthermore, functional investigations showed an increased IFN γ production as well, presumably derived from the CCR6 overexpressing CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺ memory T cells, whereas there was no difference in the production of IL-17.

The second cell population found to be increased were CXCR3-expressing CD8⁺ cells, which also express CCR7.

Additionally, this study separated T1DM into two groups according to disease duration (recent onset T1DM RO and long-standing T1DM LS) in order to evaluate changes throughout disease progression. However, no such change could be found, possibly resulting from rather short disease duration of long-standing T1DM in our cohort.

Our findings concerning the CCR6 and IFN γ expression would be in accordance to other studies, showing a potential pathogenic role of non-classic

6 Zusammenfassung

Th1 cells but not primarily of Th17 cells, as formerly suspected. A quantitative lack of T_{reg} as a cause for the increased $IFN\gamma$ production seems unlikely according to the results of our study, as there were higher proportions of $CD25^+CD127^{-/dim}$ cells.

The co-expression of CXCR3 and CCR7 is interesting regarding earlier studies that could not find positive effects of a CXCR3 blockade in T1DM, despite an evident overexpression of CXCR3 on T cells in the pancreas.

Taken together, our results suggest increased numbers of $IFN\gamma$ producing $CD4^+CCR6^+CD45RO^+CCR7^+CD28^+$ cells and of $CD8^+CXCR3^+CCR7^+$ cells in T1DM and thus a potential pathogenic importance of these two populations. However, the present results describe associations rather than causality, thus causal contribution of chemokine receptor expression to etiopathogenesis of T1DM has to be confirmed in appropriate study designs.

A more extensive investigation of $CD8^+CCR7^+CXCR3^+$ cells could potentially reveal interesting etiopathogenical aspects and targets for new therapeutic approaches. Especially the investigation of CCR7-mediated migration of these cells seems to be a promising field of study. In addition, this study again points to the potentially pathogenic role of CCR6-expressing cells, which ought to be examined further in upcoming studies.

7 Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Travers, P, Walport, M. Janeway's Immunobiology. 7 ed: Garland Science; 2008:1-27, 83, 143-176, 277-298, 314-315, 323-325, 381-387.
2. Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Mar 2011;127(3):701-721.e701-770.
3. Semenzato G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *British journal of cancer*. Mar 1990;61(3):354-361.
4. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nature immunology*. Sep 2008;9(9):970-980.
5. Engel P, Boumsell L, Balderas R, et al. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. Nov 15 2015;195(10):4555-4563.
6. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. Feb 2011;30(1):16-34.
7. Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Dec 2003;60(12):2604-2621.
8. Gueronprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2002;20:621-667.
9. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual review of cell and developmental biology*. 2011;27:539-562.
10. Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:101-132.
11. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. Sep 1 2008;112(5):1570-1580.
12. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annual review of immunology*. 1993;11:331-360.
13. Dong C, Martinez GJ. T cells: the usual subsets: *Nature*; 2010.
14. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*. Feb 2006;24(2):133-139.
15. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. Mar 19 1998;392(6673):245-252.
16. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology*. 2000;18:275-308.
17. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological reviews*. May 2010;235(1):35-54.
18. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. May 2008;9(5):503-510.

7 Literaturverzeichnis

19. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. Aug 2013;83(8):702-713.
20. Koreck A, Surányi A, Szöny BJ, et al. CD3(+)CD56(+) NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis. *Clinical and experimental immunology*. Jan 2002;127(1):176-182.
21. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews. Immunology*. Mar 2004;4(3):231-237.
22. Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine*. Nov 3 1997;186(9):1407-1418.
23. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. Oct 14 1999;401(6754):708-712.
24. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews. Immunology*. Apr 2002;2(4):251-262.
25. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. Nov 2008;73(11):975-983.
26. Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Jun 1 2002;168(11):5538-5550.
27. Okada R, Kondo T, Matsuki F, Takata H, Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *International immunology*. Sep 2008;20(9):1189-1199.
28. Maldonado A, Mueller YM, Thomas P, Bojczuk P, O'Connors C, Katsikis PD. Decreased effector memory CD45RA+ CD62L- CD8+ T cells and increased central memory CD45RA- CD62L+ CD8+ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis research & therapy*. 2003;5(2):R91-96.
29. Summers KL, O'Donnell JL, Hart DN. Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis. *Clinical and experimental immunology*. Jul 1994;97(1):39-44.
30. Johannisson A, Festin R. Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry*. Apr 1 1995;19(4):343-352.
31. Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature medicine*. Apr 2002;8(4):379-385.
32. Bagwell CB, Hill B, Munson ME, et al. Probability State Modeling of CD3 Cells from CyTOF Derived Data. *CYTO 2014*. Ft. Lauderdale, Florida, USA: Verity Software House; 2014.
33. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of

7 Literaturverzeichnis

- lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Apr 1 1986;136(7):2348-2357.
34. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*. Nov 2005;6(11):1133-1141.
 35. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Aug 1 1995;155(3):1151-1164.
 36. Long SA, Buckner JH. CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Sep 1 2011;187(5):2061-2066.
 37. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*. 2010;28:445-489.
 38. Baccala R, Kono DH, Theofilopoulos AN. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunological reviews*. Apr 2005;204:9-26.
 39. Mackay CR. CXCR3(+)CCR5(+) T cells and autoimmune diseases: guilty as charged? *The Journal of clinical investigation*. Sep 2 2014;124(9):3682-3684.
 40. Gessner A, Rollinghoff M. Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology*. Jan 2000;201(3-4):285-307.
 41. Schmidt-Weber CB. Anti-IL-4 as a new strategy in allergy. *Chemical immunology and allergy*. 2012;96:120-125.
 42. Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International immunology*. Dec 2009;21(12):1303-1309.
 43. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry*. Jan 17 2003;278(3):1910-1914.
 44. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect*. 09/18/online 2013;2:e60.
 45. Frank PG, Lisanti MP. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. Sep 2008;295(3):H926-927.
 46. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. May 11 2006;441(7090):235-238.
 47. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. Feb 2006;24(2):179-189.
 48. Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. Jul 26 2007;448(7152):484-487.

7 Literaturverzeichnis

49. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. Jul 26 2007;448(7152):480-483.
50. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. May 11 2006;441(7090):231-234.
51. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine*. Aug 6 2007;204(8):1849-1861.
52. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology*. Jun 2007;8(6):639-646.
53. Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Dec 15 2008;181(12):8391-8401.
54. Annunziato F, Romagnani S. The transient nature of the Th17 phenotype. *European journal of immunology*. Dec 2010;40(12):3312-3316.
55. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *The Journal of experimental medicine*. Mar 3 1997;185(5):817-824.
56. Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW, Gajewski TF. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annual review of immunology*. 1993;11:29-48.
57. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature reviews. Immunology*. Jan 2002;2(1):46-53.
58. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology*. Oct 2009;70(4):326-336.
59. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology*. Jul 2008;8(7):523-532.
60. Mayne CG, Williams CB. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. Jul 2013;19(8):1772-1788.
61. Voo KS, Wang YH, Santori FR, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 24 2009;106(12):4793-4798.
62. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*. Apr 30 2009;113(18):4240-4249.
63. Liston A, Gray DH. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nature reviews. Immunology*. Mar 2014;14(3):154-165.
64. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*. Jul 10 2006;203(7):1701-1711.
65. Harty JT, Bevan MJ. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Current opinion in immunology*. Feb 1999;11(1):89-93.

7 Literaturverzeichnis

66. Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Seminars in immunology*. Apr 1997;9(2):87-92.
67. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology*. Sep 2003;4(9):835-842.
68. Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, et al. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*. Jan 29 2010;32(1):116-128.
69. Wang YH, Voo KS, Liu B, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *The Journal of experimental medicine*. Oct 25 2010;207(11):2479-2491.
70. Wei G, Wei L, Zhu J, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity*. Jan 16 2009;30(1):155-167.
71. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. Jul 18 2008;29(1):44-56.
72. Sahingur SE, Yeudall WA. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. *Frontiers in immunology*. 2015;6:214.
73. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews. Immunology*. May 2008;8(5):362-371.
74. Devarajan P, Chen Z. Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good. *Immunologic research*. Dec 2013;57(1-3):12-22.
75. Prelog M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmunity reviews*. Feb 2006;5(2):136-139.
76. Goronzy Jö J, Lee WW, Weyand CM. Aging and T-cell diversity. *Experimental gerontology*. May 2007;42(5):400-406.
77. Mayerl C, Prelog M. Immunosenescence and juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity reviews*. Mar 2012;11(5):297-300.
78. Prelog M, Schwarzenbrunner N, Sailer-Hock M, et al. Premature aging of the immune system in children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. Jul 2008;58(7):2153-2162.
79. Hofer J, Hofer S, Zlamy M, et al. Elevated proportions of recent thymic emigrants in children and adolescents with type 1 diabetes. *Rejuvenation research*. Oct 2009;12(5):311-320.
80. Rosenbauer J, Bächle C, Stahl A, et al. Prevalence of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents in Germany. *Diabetologia*. Vol 55 (Suppl. 1)2012:369 (Abstract).
81. Castillo K, Stahl A, Bächle C, Holl RW, Giani G, Rosenbauer J. Spatial distribution and time trend of type 1 diabetes mellitus in children in North Rhine-Westphalia, Germany. *Pediatric Diabetes*. Vol 13 (Suppl. 17)2012:46-47.

7 Literaturverzeichnis

82. The DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. Aug 2006;23(8):857-866.
83. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. Jun 13 2009;373(9680):2027-2033.
84. Liese AD, D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, et al. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*. Oct 2006;118(4):1510-1518.
85. Neu A, Feldhahn L, Ehehalt S, Hub R, Ranke MB, on behalf of the DgB-W. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents is still a rare disease in Germany: a population-based assessment of the prevalence of type 2 diabetes and MODY in patients aged 0–20 years. *Pediatric Diabetes*. 2009;10(7):468-473.
86. Lynne LL, Madhusmita M. Epidemiology, presentation, and diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. 2016.
87. Quinn M, Fleischman A, Rosner B, Nigrin DJ, Wolfsdorf JL. Characteristics at diagnosis of type 1 diabetes in children younger than 6 years. *J Pediatr*. Mar 2006;148(3):366-371.
88. Sonmez B, Bozkurt B, Atmaca A, Irkec M, Orhan M, Aslan U. Effect of glycemic control on refractive changes in diabetic patients with hyperglycemia. *Cornea*. Jul 2005;24(5):531-537.
89. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. *Pediatric clinics of North America*. Dec 2005;52(6):1553-1578.
90. Roche EF, Menon A, Gill D, Hoey H. Clinical presentation of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. Jun 2005;6(2):75-78.
91. Kerner W, Brückel, J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel*. Vol 8. Stuttgart, New York: Georg Thieme; 2013:104-107.
92. ASA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. January 2011;34(Suppl. 1).
93. Danne T. Diabetes mellitus im Kindesalter. In: Speer C, Gahr, M, ed. *Pädiatrie*. 4th ed. Berlin: Springer; 2013:768-779.
94. Jaber-Douraki M, Liu SW, Pietropaolo M, Khadra A. Autoimmune responses in T1DM: quantitative methods to understand onset, progression, and prevention of disease. *Pediatr Diabetes*. May 2014;15(3):162-174.
95. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. Nov 24 1994;331(21):1428-1436.
96. Estella E, McKenzie MD, Catterall T, et al. Granzyme B-mediated death of pancreatic beta-cells requires the proapoptotic BH3-only molecule bid. *Diabetes*. Aug 2006;55(8):2212-2219.
97. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, et al. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or beta-cell suicide revisited. *Diabetes*. May 2011;60(5):1370-1379.

7 Literaturverzeichnis

98. Coppieters KT, von Herrath MG. Histopathology of type 1 diabetes: old paradigms and new insights. *The review of diabetic studies : RDS*. 2009;6(2):85-96.
99. Healey D, Ozegbe P, Arden S, Chandler P, Hutton J, Cooke A. In vivo activity and in vitro specificity of CD4+ Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice. *The Journal of clinical investigation*. Jun 1995;95(6):2979-2985.
100. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science (New York, N.Y.)*. May 26 1995;268(5214):1185-1188.
101. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism reviews*. Jun 1998;14(2):129-151.
102. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology*. Oct 2012;13(10):991-999.
103. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. Jul 28 2011;475(7357):514-518.
104. Nistala K, Adams S, Cambrook H, et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 17 2010;107(33):14751-14756.
105. Bending D, De la Pena H, Veldhoen M, et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *The Journal of clinical investigation*. Mar 2009;119(3):565-572.
106. Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *European journal of immunology*. Jan 2009;39(1):216-224.
107. Zhang Y, Bandala-Sanchez E, Harrison LC. Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. Aug 2012;19(4):271-278.
108. Sarikonda G, Pettus J, Phatak S, et al. CD8 T-cell reactivity to islet antigens is unique to type 1 while CD4 T-cell reactivity exists in both type 1 and type 2 diabetes. *Journal of autoimmunity*. May 2014;50:77-82.
109. Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *The Journal of experimental medicine*. Jan 16 2012;209(1):51-60.
110. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA, Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *The Journal of experimental medicine*. Jan 1 1996;183(1):67-76.
111. Böhm B, Dreyer, M, Fritsche, A, Fuchtenbusch, M, Gözl, s, Martin, S. Therapie des Typ-1-Diabetes. *Diabetologie und Stoffwechsel*. Vol 8. Stuttgart, New York: Thieme; 2013:133-143.
112. Kerbl R, Kurz, R, Roos, R, Wessel, LM, Lange, B. *Checkliste Pädiatrie*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2011.

7 Literaturverzeichnis

113. Lohmann T, Laue S, Nietzschmann U, et al. Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes*. Aug 2002;51(8):2474-2480.
114. Smerdon RA, Peakman M, Hussain MJ, et al. Increase in simultaneous coexpression of naive and memory lymphocyte markers at diagnosis of IDDM. *Diabetes*. Jan 1993;42(1):127-133.
115. Hedman M, Faresjo M, Axelsson S, Ludvigsson J, Casas R. Impaired CD4 and CD8 T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children. *Clinical and experimental immunology*. Sep 2008;153(3):360-368.
116. Waid DM, Wagner RJ, Putnam A, et al. A unique T cell subset described as CD4loCD40+ T cells (TCD40) in human type 1 diabetes. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. Aug 2007;124(2):138-148.
117. Kukreja A, Cost G, Marker J, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *The Journal of clinical investigation*. Jan 2002;109(1):131-140.
118. Halminen M, Simell O, Knip M, Ilonen J. Cytokine expression in unstimulated PBMC of children with type 1 diabetes and subjects positive for diabetes-associated autoantibodies. *Scandinavian journal of immunology*. May 2001;53(5):510-513.
119. Romero P, Zippelius A, Kurth I, et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Apr 01 2007;178(7):4112-4119.
120. Moro-Garcia MA, Alonso-Arias R, Lopez-Larrea C. When Aging Reaches CD4+ T-Cells: Phenotypic and Functional Changes. *Frontiers in immunology*. 2013;4:107.
121. Koch S, Larbi A, Derhovanessian E, Ozcelik D, Naumova E, Pawelec G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immunity & ageing : I & A*. Jul 25 2008;5:6.
122. Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, et al. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes*. Mar 2011;60(3):857-866.
123. Wilson RG, Anderson J, Shenton BK, White MD, Taylor RM, Proud G. Natural killer cells in insulin dependent diabetes mellitus. *British medical journal (Clinical research ed.)*. Jul 26 1986;293(6541):244.
124. Pontesilli O, Chase HP, Carotenuto P, Herberger MJ, Hayward AR. T-lymphocyte subpopulations in insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Clinical and experimental immunology*. Jan 1986;63(1):68-72.
125. Akesson K, Tompa A, Ryden A, Faresjo M. Low expression of CD39 /CD45RA on Treg cells in type 1 diabetic children in contrast to high expression of CD101 /CD129 on Treg cells in children with celiac disease. *Clinical and experimental immunology*. Nov 24 2014.
126. Chandy KG, Charles MA, Buckingham B, Waldeck N, Kershner A, Gupta S. Deficiency of monoclonal antibody (Leu 7) defined NK cells in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *Immunology letters*. 1984;8(2):89-91.
127. Herold KC, Huen A, Gould L, Traisman H, Rubenstein AH. Alterations in lymphocyte subpopulations in type 1 (insulin-dependent) diabetes

7 Literaturverzeichnis

- mellitus: exploration of possible mechanisms and relationships to autoimmune phenomena. *Diabetologia*. Jul 1984;27 Suppl:102-105.
128. Hussain MJ, Alviggi L, Millward BA, Leslie RD, Pyke DA, Vergani D. Evidence that the reduced number of natural killer cells in type 1 (insulin-dependent) diabetes may be genetically determined. *Diabetologia*. Dec 1987;30(12):907-911.
129. Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, et al. Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *International immunology*. Jul 2001;13(7):887-896.
130. Rodacki M, Svoren B, Butty V, et al. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes*. Jan 2007;56(1):177-185.
131. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *The Journal of clinical investigation*. Sep 2002;110(6):793-800.
132. Wilson SB, Kent SC, Patton KT, et al. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature*. Jan 8 1998;391(6663):177-181.
133. Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, et al. High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes care*. Oct 2002;25(10):1818-1823.
134. Berzins SP, Kyparissoudis K, Pellicci DG, et al. Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies. *Immunology and cell biology*. Jun 2004;82(3):247-252.
135. Tsutsumi Y, Jie X, Ihara K, et al. Phenotypic and genetic analyses of T-cell-mediated immunoregulation in patients with Type 1 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. Oct 2006;23(10):1145-1150.
136. Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, et al. Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. *Cellular immunology*. 2010;262(2):75-79.
137. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Ferrannini E, Fallahi P. CXCR3, CXCL10 and type 1 diabetes. *Cytokine & growth factor reviews*. Feb 2014;25(1):57-65.
138. Aso Y, Matsuura H, Momobayashi A, et al. Profound reduction in T-helper (Th) 1 lymphocytes in peripheral blood from patients with concurrent type 1 diabetes and Graves' disease. *Endocrine journal*. Jun 2006;53(3):377-385.
139. Yamada S, Oikawa Y, Sakai G, Atsumi Y, Maruyama T, Shimada A. Expression levels of CXC chemokine receptors 3 are associated with clinical phenotype of type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Oct 2006;1079:186-189.
140. Milicic T, Jotic A, Markovic I, et al. High Risk First Degree Relatives of Type 1 Diabetics: An Association with Increases in CXCR3+ T Memory Cells Reflecting an Enhanced Activity of Th1 Autoimmune Response. *International Journal of Endocrinology*. 2014;2014:9.

7 Literaturverzeichnis

141. Sarkar SA, Lee CE, Victorino F, et al. Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. *Diabetes*. Feb 2012;61(2):436-446.
142. Ciampolillo A, Guastamacchia E, Caragiulo L, et al. In vitro secretion of interleukin-1 beta and interferon-gamma by peripheral blood lymphomononuclear cells in diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice*. Aug-Sep 1993;21(2-3):87-93.
143. Stechova K, Bohmova K, Vrabelova Z, et al. High T-helper-1 cytokines but low T-helper-3 cytokines, inflammatory cytokines and chemokines in children with high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. Sep 2007;23(6):462-471.
144. Cavallo MG, Pozzilli P, Bird C, et al. Cytokines in sera from insulin-dependent diabetic patients at diagnosis. *Clinical and experimental immunology*. Nov 1991;86(2):256-259.
145. Karlsson MG, Lawesson SS, Ludvigsson J. Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetologia*. Jun 2000;43(6):742-749.
146. Ryden A, Faresjo M. Altered immune profile from pre-diabetes to manifestation of type 1 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. Apr 2013;100(1):74-84.
147. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Aug 1 2010;185(3):1959-1967.
148. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia*. Jan 1996;39(1):60-69.
149. Kallmann BA, Huther M, Tubes M, et al. Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes*. Feb 1997;46(2):237-243.
150. Hussain MJ, Maher J, Warnock T, Vats A, Peakman M, Vergani D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia*. Mar 1998;41(3):343-349.
151. Arif S, Tree TI, Astill TP, et al. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *The Journal of clinical investigation*. Feb 2004;113(3):451-463.
152. Ferraro A, Soggi C, Stabilini 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. *Diabetes*. Nov 2011;60(11):2903-2913.
153. Reinert-Hartwall L, Honkanen J, Salo HM, et al. Th1/Th17 plasticity is a marker of advanced beta cell autoimmunity and impaired glucose tolerance in humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Jan 1 2015;194(1):68-75.
154. Arif S, Moore F, Marks K, et al. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death. *Diabetes*. Aug 2011;60(8):2112-2119.

7 Literaturverzeichnis

155. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, et al. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Oct 1 2010;185(7):3814-3818.
156. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, et al. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *European journal of immunology*. Dec 2012;42(12):3180-3188.
157. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. Mar 2007;56(3):604-612.
158. Lawson JM, Tremble J, Dayan C, et al. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology*. Dec 2008;154(3):353-359.
159. Moniuszko M, Glowinska-Olszewska B, Rusak 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. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:459210.
160. Coppieters KT, Amirian N, Pagni PP, et al. Functional redundancy of CXCR3/CXCL10 signaling in the recruitment of diabetogenic cytotoxic T lymphocytes to pancreatic islets in a virally induced autoimmune diabetes model. *Diabetes*. Jul 2013;62(7):2492-2499.
161. Shi Z, Okuno Y, Rifa'i M, et al. Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *European journal of immunology*. Aug 2009;39(8):2106-2119.
162. Frigerio S, Junt T, Lu B, et al. Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nature medicine*. Dec 2002;8(12):1414-1420.
163. Christen U, McGavern DB, Luster AD, von Herrath MG, Oldstone MB. Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Dec 15 2003;171(12):6838-6845.
164. Morimoto J, Yoneyama H, Shimada A, et al. CXC chemokine ligand 10 neutralization suppresses the occurrence of diabetes in nonobese diabetic mice through enhanced beta cell proliferation without affecting insulinitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. Dec 1 2004;173(11):7017-7024.
165. Christen S, Holdener M, Beerli C, et al. Small molecule CXCR3 antagonist NIBR2130 has only a limited impact on type 1 diabetes in a virus-induced mouse model. *Clinical and experimental immunology*. Sep 2011;165(3):318-328.
166. Shan Z, Xu B, Mikulowska-Mennis A, Michie SA. CCR7 directs the recruitment of T cells into inflamed pancreatic islets of nonobese diabetic (NOD) mice. *Immunologic research*. May 2014;58(2-3):351-357.

7 Literaturverzeichnis

- 167.** Inokuma MS, Maino VC, Bagwell CB. Probability state modeling of memory CD8(+) T-cell differentiation. *Journal of immunological methods*. Nov 29 2013;397(1-2):8-17.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Differenzierungsstadien von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	10
Abbildung 1.2	Molekulare Struktur der vier Chemokin-Klassen	17
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer	39
Abbildung 4.1	Gating von Lymphozyten sowie B-, T-, NK- und NKT-Zellen	49
Abbildung 4.2	NK- und NKT-Zellen in den Studiengruppen	50
Abbildung 4.3	Grundlegende Gating-Strategie	54
Abbildung 4.4	Erhöhte Expression von CCR7 bei T1DM	56
Abbildung 4.5	Gating der CXCR3 ⁺ Population	60
Abbildung 4.6	Vermehrte CXCR3-Expression auf CD8 ⁺ CCR7 ⁺ Populationen	61
Abbildung 4.7	Gating der CCR5 ⁺ Population	63
Abbildung 4.8	Verminderte CCR5-Expression auf CD8 ⁺ CD45RA ⁺ Zellen bei T1DM	64
Abbildung 4.9	Gating der CCR6 ⁺ Population	65
Abbildung 4.10	Erhöhte CCR6-Expression bei T1DM	66
Abbildung 4.11	Gating der CD161 ⁺ Population	68
Abbildung 4.12	Erhöhte Ko-Expression von CCR5 und CCR6 bei T1DM	70
Abbildung 4.13	Gating von IL-4	71
Abbildung 4.14	Gating von IFN γ , TNF α und IL-17	72
Abbildung 4.15	Vermehrte IFN γ -Expression in CD4 ⁺ Zellen bei T1DM	73
Abbildung 4.16	Verminderte TNF α -Produktion in CD8 ⁺ Zellen bei T1DM	75
Abbildung 4.17	T _{reg} -Gating und vermehrtes Vorkommen bei T1DM LS	80

9 Tabellenverzeichnis

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Häufigkeiten der Symptome bei T1DM-Diagnosestellung	22
Tabelle 1.2	Diagnosekriterien eines Diabetes mellitus	23
Tabelle 3.1	Medien und Medienzusätze	32
Tabelle 3.2	Chemikalien	33
Tabelle 3.3	Puffer	33
Tabelle 3.4	Stimulantien	33
Tabelle 3.5	Antikörper	34
Tabelle 3.6	Gerätschaften	36
Tabelle 3.7	Laborbedarf	37
Tabelle 3.8	Färbeschema für die Phänotypisierung	41
Tabelle 3.9	Färbeschema für die Zytokinbestimmung	43
Tabelle 3.10	Eigenschaften der verwendeten Fluorochrome	45
Tabelle 4.1	Alter- und Geschlechterverteilung der Probanden	48
Tabelle 4.2	Verteilung von B-, T- und NK-Zell-Markern	51
Tabelle 4.3	Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD4 ⁺ Lymphozyten	55
Tabelle 4.4	Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD8 ⁺ Lymphozyten (Teil 1)	57
Tabelle 4.5	Expression von CD45RA, CCR7 und CD28 auf CD8 ⁺ Lymphozyten (Teil 2)	58
Tabelle 4.6	Expression von CXCR3 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	62
Tabelle 4.7	Expression von CCR5 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	64
Tabelle 4.8	Expression von CCR6 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	67
Tabelle 4.9	Expression von CD161 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	69
Tabelle 4.10	Ko-Expression von CCR5 und CCR6 auf CD4 ⁺ Lymphozyten	70
Tabelle 4.11	Produktion von IFN γ in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	74
Tabelle 4.12	Produktion von IFN γ und TNF α in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	76
Tabelle 4.13	IL-17-Produktion in CD4 ⁺ Lymphozytenpopulationen	77

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.14	Produktion von IL-4 in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Lymphozyten	78
Tabelle 4.15	T _{reg} im Vergleich der Studiengruppen	81
Tabelle 5.1	Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse	102

Danksagung

- Frau Prof. Dr. med. M. Prelog für die Unterstützung bei der Auswahl des Themas und die Betreuung sowie Korrektur meiner Arbeit
- Herrn Prof. Dr. C. P. Speer, FRCPE, Direktor der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg, für die Möglichkeit, an seiner Klinik zu promovieren
- Herrn Dr. rer. nat. G. Almanzar und Frau K. Höfner für die freundliche Unterstützung bei jeglichen Fragen bezüglich der Laborarbeiten
- auch allen weiteren Mitarbeitern des Kinder-Rheumatologischen Labors ebenfalls für die kompetente Unterstützung bei Fragen
- allen Mitarbeitern des Universitätsklinikums, die bei der Probengewinnung mitgewirkt und diese somit überhaupt erst möglich gemacht haben, sowohl auf den Stationen der Kinderklinik, als auch in der Kinderchirurgie und den ambulanten Sprechstunden
- allen Mitarbeitern der Kinderdiabetologischen Schwerpunkt-Praxis Dr. Lieb in Heilbronn für die ebenfalls tatkräftige Unterstützung
- allen Probanden und deren Eltern für die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie
- meinem Bruder für die geduldige und ausführliche Beratung in allen statistischen Fragen
- meinen Eltern und meiner Frau für die Unterstützung und konstruktive Kritik an meiner Arbeit