

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Kastenmüller

**Die Bedeutung von PTPN22
für die Differenzierung, Suppressivität und Verteilung von T-Zellen
im NOD-Maus-Modell**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dirk Mathias Mehrens

aus Kiel

Würzburg, Juni 2018



Referent/Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz

Koreferent/Koreferentin: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. univ. Andreas Beilhack

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2019

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Typ-1-Diabetes	2
1.1.1 Definition & Bedeutung	2
1.1.2 Ursachen & Risikofaktoren	3
1.1.2.1 Genetik	4
1.1.2.2 Umwelt	5
1.1.3 Pathogenese	7
1.1.3.1 Autoantigenentstehung und β -Zellvulnerabilität	8
1.1.3.2 APCs: Antigenaufnahme, Prozessierung und Migration in pLNs	9
1.1.3.3 Aktivierung und Priming von diabetogenen T-Zellen in pLNs	10
1.1.3.4 Migration von autoreaktiven T-Zellen in Langerhans-Inseln	13
1.1.3.5 Insulitis	15
1.1.3.6 Gestörte periphere Immuntoleranz	20
1.1.3.7 Post-Insulitis-Stadium	22
1.2 PTPN22	22
1.2.1 Einleitung	22
1.2.2 Die TCR-Signalkaskade und ihre Beeinflussung durch PTPN22	23
1.2.3 PTPN22 und Autoimmunität	24
1.3 Ziel der Arbeit	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Material	32
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	32
2.1.2 Mauslinie	34
2.1.3 Medien & Buffer	34
2.1.4 Kits	35
2.1.5 Geräte/Materialien	35
2.1.6 Software	37
2.1.7 Antikörper	37
2.2 Methodik	38
2.2.1 Mauslinien und <i>ptpn22</i> -Knockdown	38
2.2.2 Genotypisierung	39
2.2.3 Knockdown-Initiierung	39
2.2.4 Zelldifferenzierung	40

2.2.5 Analyse.....	41
2.2.5.1 Flusszytometrie	41
2.2.5.2 Immunoassay.....	43
2.2.5.3 Suppression Assay.....	44
2.2.6 Insulitis-Experiment.....	45
2.2.6.1 Pankreasverdauung.....	45
2.2.6.2 Analyse.....	46
2.2.7 Statistik.....	48
3. Ergebnisse	49
3.1 PTPN22 und die T-Zell-Differenzierung.....	50
3.1.1 Einfluss von <i>ptpn22</i> -KD auf Splenozyten.....	50
3.1.2 Einfluss von <i>ptpn22</i> -KD auf naive T-Zellen.....	55
3.1.3 Intrinsische bzw. extrinsische Wirkung des <i>ptpn22</i> -KD auf die T-Zellentwicklung .	59
3.1.4 Zusammenfassung.....	61
3.2 PTPN22 und die Suppressivität von Treg-Zellen	62
3.3 PTPN22 und die Zellverteilung während der Insulitis	65
4. Diskussion.....	73
4.1 T-Zell Differenzierung in Th1- und Th17-Zellen	74
4.2 Suppressivität von Treg-Zellen	80
4.3 PTPN22 und Insulitis in der NOD-Maus	83
4.4 Konklusion	89
5. Zusammenfassung	92
6. Quellenverzeichnis.....	94

Abkürzungen

APC: Antigen-präsentierende Zelle

BCR: B-Zellrezeptor

CD45-E613R-Mutation: Mutation von CD45, die eine Lupus-erythematoses-ähnliche Erkrankung hervorrufen kann.

CTL: Zytotoxische T-Zellen

DC: Dendritische Zelle

ER: Endoplasmatisches Retikulum

GADA: Glutamatdecarboxylase

GWAS: Genomweite Assoziationsstudie

HLA: Humane-Leukozytenantigen-Region

Hypomorph: Mutation, die nur zu einer Abschwächung des Genprodukts führt.

IAA: Autoantikörper gegen Insulin

IFN- γ : Interferon- γ

IL-1 β : Interleukin-1 β

Jurkat-Zellen: Immortalisierte menschliche T-Zelllinie

KD: Knockdown

LYP: Lymphoid tyrosine phosphatase

MAP: Mykobakterium Avium ssp. paratuberculosis

MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex

MyD88-Protein: Adapterprotein von TLRs zur Aktivierung von NF- κ B

NPOD: „Network for pancreatic organ donors with diabetes“

PAMP: Pathogen-assoziiertes molekulares Muster

PEP: PEST domain-enriched tyrosine phosphatase

pLN: Pankreatischer Lymphknoten

PRR: Pathogen Recognition Receptors

PTPN22: Protein Tyrosin Phosphatase Nicht-Rezeptortyp 22 (Protein)

ptpn22: Gen auf Chromosom 1p13.2, welches PTPN22 exprimiert.

ROS: Reaktive Sauerstoffspezies

shRNA: Short hairpin RNA

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SOCS1: Suppressor of cytokine signaling 1

T1D: Typ-1-Diabetes

TCR: T-Zell-Rezeptor

Tconv-Zellen: Konventionelle T-Zellen

Teff-Zelle: Effektor-T-Zelle

Th-Zelle: T-Helfer-Zelle

TLR: Toll-like-Rezeptoren

TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor α

Treg-Zelle: Regulatorische T-Zelle

Typ-1-IFN: Interferon, welches von vielen Zelltypen gebildet werden kann als Reaktion auf virale und bakterielle Erreger.

1. Einleitung

1.1 Typ-1-Diabetes

1.1.1 Definition & Bedeutung

Typ-1-Diabetes (T1D) ist charakterisiert durch eine Hyperglykämie aufgrund eines absoluten Insulinmangels, bedingt durch eine immunvermittelte Zerstörung der Insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas [1].

Weltweit leiden über 415 Millionen Menschen an Diabetes mellitus [2]. In den Industrienationen machen davon 7-12% T1D-Erkrankte aus [3-6]. Dies entspricht der höchsten Prävalenz von T1D weltweit [2]. Alleine in Deutschland sind ca. 200.000 Menschen an T1D erkrankt [7]. Betroffen sind dabei vor allem Kinder mit einem Erkrankungsgipfel im Alter von 10-14 Jahren [8-10]. Jedoch sind Erstdiagnosen bis in die neunte Lebensdekade beschrieben worden [11]. Obwohl Frauen von vielen Autoimmunerkrankungen häufiger betroffen sind, zeigt sich für T1D bei Erwachsenen eine erhöhte Prävalenz und Mortalität für Männer [12]. Dieser Trend ist bei Kindern allerdings nur vermindert ausgeprägt [13, 14]. Dabei weist diese Geschlechterverteilung eine Ortsabhängigkeit auf. So sind in Regionen wie Europa, in denen eine hohe Inzidenz von T1D vorliegt, eher Männer und in Regionen niedriger Inzidenz eher Frauen betroffen [15, 16]. 86000 Kinder erkranken jährlich neu an T1D. Dabei ist seit mehreren Jahrzehnten eine Zunahme der Inzidenz von ca. 3% nachgewiesen worden [2, 17-19]. Die Steigerung der Neuerkrankungen ist besonders ausgeprägt in der Altersgruppe von 0-5 Jahren [8, 18, 20]. Neben dem Alter ist zudem eine örtliche Abhängigkeit der Inzidenzsteigerung mit höheren Inzidenzraten in Skandinavien und Osteuropa [2] sowie einem weltweiten Nord-Süd-Gefälle [21] zu beobachten.

Die Behandlung des T1D besteht in einer Substitution der erloschenen Insulinproduktion. Dabei sind verschiedene Insuline erhältlich, die sich v.a. in ihrer Wirkdauer und ihrem Wirkungseintritt unterscheiden, respektive Basalinsulin und schnell wirksamen Insulinen. Zudem sind neben der subkutanen Verabreichung mittels Insulinpens andere Formen der Applikation verfügbar, wie z.B. Insulinpumpen, sodass eine Anpassung der Therapie an Lebensstil und Compliance der Patienten gewährleistet

ist. Obwohl die Erkrankung derzeit nicht heilbar ist, bestehen Ansätze die endogene Insulinproduktion zu ersetzen. So gibt es bereits klinische Studien zu Pankreastransplantationen [22] sowie experimentelle Erfolge in der Züchtung von β -Zellen [23] aus Stammzellen. Ebenfalls wird an einem Aufhalten der β -Zellzerstörung nach Ausbruch der Erkrankung geforscht [24, 25]. Von einem Ersatz der Insulintherapie ist in naher Zukunft jedoch nicht auszugehen [26].

Ohne Therapie führt T1D unweigerlich zum Tod. Unter Therapie hat sich die Lebenserwartung über die Jahre zwar immer weiter erhöht, liegt jedoch immer noch ca. 10 Jahre unter der durchschnittlichen Lebenserwartung [27]. Trotz Insulinsubstitution können weiterhin schwerwiegende Komplikationen auftreten. So können entgleiste Blutzuckerspiegel kurzfristig zu einem lebensbedrohlichen, ketoazidotischen Koma führen. Unter chronisch schlecht eingestelltem Blutzucker steigt das Risiko für makro- und mikrovaskuläre Komplikationen. So ist heutzutage in Verbindung mit einer höheren Lebenserwartung ebenfalls eine erhöhte Zahl an kardiovaskulären Ereignissen für T1D-Patienten zu beobachten [28, 29]. Zu den mikrovaskulären Komplikationen zählen diabetische Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie [30]. Ein zu tiefer Blutzuckerspiegel bei Übersubstitution, körperlicher Betätigung oder Erkrankungen kann zu Bewusstlosigkeit mit langfristig erhöhtem Risiko für spätere Demenz [31] oder den Tod führen. Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten und Ansätzen zur endogenen Insulinsubstitution stellt die Behandlung der Autoimmunreaktion daher weiterhin einen zentralen Punkt in der Forschung an T1D dar.

1.1.2 Ursachen & Risikofaktoren

Wie für viele andere Autoimmunerkrankungen wird ebenfalls für T1D eine multifaktorielle Genese angenommen. Wichtig für die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung sind v.a. eine genetische Prädisposition und Umweltfaktoren.

1.1.2.1 Genetik

Mittels „whole genome sequencing“ und genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) konnten in den letzten Jahrzehnten über 40 Genloci identifiziert werden, die mit T1D assoziiert sind [32]. Wichtigster Vertreter ist die humane-Leukozytenantigen (HLA)-Region auf Chromosom 6, welche ca. 50% der genetischen Suszeptibilität für T1D ausmacht [33]. Die Klasse-II-HLA-Allele DR3 und DR4 sind mit einem erhöhten Risiko für T1D assoziiert. Zudem gelten das Allel DQB1*0302 des DR4-Haplotyps und DQB1*0201 des DR3-Haplotyps heutzutage als vornehmliche Marker für Suszeptibilität [34]. Obwohl 90-95% aller jungen Kinder mit T1D Träger eines oder beider Haplotypen sind, erkranken jedoch nur 5% aller Träger eines mit T1D-assoziierten HLA-Haplotyps.

Für HLA - in Wirbeltieren auch als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bezeichnet - liegen zwei kodominante Allele vor, die meistens als Haplotyp, also gekoppelt, vererbt werden. Aufgabe der kodierten HLA-Moleküle ist die Präsentation von Antigenen an Immunzellen.

Neben der Antigenpräsentation sind spezifische DR-Allele auch mit der Produktion von Antikörpern gegen körpereigene Antigene assoziiert. So steht das DR3-Allel in Zusammenhang mit Autoantikörperbildung gegen Insulin (IAA) [35] und das DR4-Allel mit Antikörperbildung gegen Glutamatdecarboxylase (GADA) [36].

Neben HLA-Molekülen sind noch drei weitere Gen-loci mit einer Odds Ratio größer 1,2 bekannt, respektive INS, PTPN22 und IL2RA [37], wobei auf PTPN22 an anderer Stelle gesondert eingegangen wird.

Das INS-Gen ist für die Expressierung von Insulin zuständig. Dabei liegt aufgrund einer Variablen Anzahl an Mikrosatelliten ein gewisser Polymorphismus des Genes vor, der je nach Länge der Mikrosatelliten mit einem Schutz oder erhöhtem Risiko für T1D assoziiert ist. Dies wird mit einer veränderten Expression der Allele - abhängig von ihrer Länge - in Pankreas und Thymus und somit einer veränderten Selektion von autoreaktiven T-Zellen erklärt [38, 39].

IL2RA ist Bestandteil von CD25, welches auf regulatorischen T(Treg)-Zellen exprimiert wird und IL-2 bindet, welches für die Proliferation und das Überleben der Zellen von Bedeutung ist. Es wird davon ausgegangen, dass ein Single Nucleotide

Polymorphism (SNP) zur verminderten Bildung von IL2-Rezeptoren führt, wodurch die Funktion von Treg-Zellen beeinträchtigt wird [40].

In Zusammenschau sind die betroffenen Gene sowie die zusätzlichen Suszeptibilitätsloci für T1D Großteils mit dem Immunsystem assoziiert, was dessen Bedeutung für die Krankheitsgenese veranschaulicht.

1.1.2.2 Umwelt

Aufgrund mehrerer Untersuchungsergebnisse besteht die Annahme, dass die Pathogenese von T1D auch durch Umweltfaktoren beeinflusst wird. So sind der Anstieg der Inzidenz in einem so kurzen Zeitraum sowie die örtliche Abhängigkeit der Inzidenz nicht alleine auf genetische Faktoren zurückzuführen.

Diese These wird durch Migrationsstudien, einen Anstieg der Inzidenz in genetisch stabilen Populationen sowie Zwillingsstudien gestützt [19]. Zudem wurde festgestellt, dass Umweltfaktoren einen größeren Einfluss auf Individuen haben, die eine niedrigere genetische Prädisposition für T1D aufweisen [41, 42]. Dies steht im Einklang mit Studien, die in jungen Erkrankten weniger HLA-assoziierte Fälle von T1D nachweisen konnten, obwohl gerade in dieser Gruppe in den letzten Jahrzehnten die Inzidenz mit am stärksten angestiegen ist [41, 42].

Als ein nichtgenetischer Hauptrisikofaktor für T1D gelten Virusinfekte. Hierfür sprechen die enge zeitliche und saisonale Assoziation von Enterovirus-Infektionen, z.B. durch Coxsackie-Virus-B, und dem Auftreten erster diabetogener Autoantikörper im Herbst und Winter, v.a. bei jungen Kindern. Daten hierzu stammen aus einer finnischen Studie und müssen in anderen Kohorten bestätigt werden [43].

Auch histologisch zeigen sich im Pankreas deutliche Korrelationen zwischen dem Befallmuster von Enteroviruserkrankungen und Entzündungen im Zuge von T1D. Zusätzlich weisen β -Zellen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Enteroviren aufgrund einer eingeschränkten viralen Clearance und hiermit einhergehender Persistenz der Entzündung auf. Dabei wird vermutet, dass die Viruserkrankung über direkte Zytolyse bzw. über molekulares Mimikry von β -Zellantigenen zur Initiierung der Autoimmunreaktion gegen β -Zellen beiträgt [44].

Darüber hinaus weisen weitere Studien einen Einfluss von bestimmten Umweltfaktoren im Darm auf die Pathogenese von T1D nach.

So bestehen Zusammenhänge zwischen dem Darm-Mikrobiom und der Immunantwort in Studien an NOD-Mäusen ohne MyD88-Protein, wobei Stuhltransplantationen einen Schutz vor T1D vermittelten [45].

Untersuchungen an T1D-Patienten und NOD-Mäusen konnten ebenfalls Unterschiede des Mikrobioms während des Erkrankungsbeginns im Vergleich zu gesunden Individuen nachweisen [43].

Die Veränderungen des Darm-Mikrobioms und der bereits im Alter von unter einem Jahr auftretenden Autoantikörper [46] weisen auch auf den Einfluss der Ernährung auf die Erkrankung hin. So stehen Stillen, Proteine und Insulin aus Kuhmilch sowie Beeren und Früchte im Verdacht einen Einfluss auf das Krankheitsrisiko zu haben mit zum Teil unterschiedlichen Forschungsergebnissen [19, 30].

Auch Stress auf β -Zellen konnte als Risikofaktor identifiziert werden. So stellt Übergewicht ein erhöhtes Risiko für ältere Kinder dar an T1D zu erkranken. Des Weiteren sind physiologisch aktive β -Zellen einem erhöhten Risiko für zytokinvermittelte Beschädigung ausgesetzt [43].

Vitamin D-Supplementierung in der frühen Kindheit führt zu einem verminderten Risiko an T1D zu erkranken [47]. Darüber hinaus hat bereits die Einnahme von Vitamin D während der Schwangerschaft einen schützenden Effekt auf den Embryo [48]. Weitere Studien weisen auf die Bedeutung weiterer früher Einflussfaktoren auf den Krankheitsverlauf hin. So war der Nachweis von Antikörpern gegen GAD, Rotavirus und Coxsackie-B3-Virus im Blut von Schwangeren mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von T1D des Kindes assoziiert [49]. In Versuchen mit NOD-Mäusen konnte die Bedeutung früher Einflüsse auf Embryo und Immunsystem weiter bestätigt werden. So konnte der Impfung schwangerer NOD-Mäuse mit Proinsulin ein protektiver Effekt auf deren Nachkommen beigemessen werden [50].

Dabei wirken die einzelnen Risikofaktoren nicht nur alleine, sondern die Interaktion untereinander hat Einfluss auf die Pathogenese. So war die Risikovariante von PTPN22 mit einer erhöhten Inzidenz von T1D assoziiert, wenn Kinder im Alter unter 6 Monaten mit Milchpulver ernährt wurden, jedoch nicht wenn die Ernährung im Alter von über

6 Monaten begonnen wurde [51], was die Bedeutung zeitlich abhängiger Schritte in der Pathogenese weiter unterstreicht.

1.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese von T1D stellt sich als sehr komplex dar. Einige Aspekte der Erkrankung sollen daher zum Verständnis im Folgenden näher beschrieben werden. Bezüglich Pathomechanismus, Antigenen, zellulären Mechanismen, Inflammation und T-Zellmigration wurde sich als Quelle auf einige Übersichtsarbeiten bezogen [52-56]. Zur Übersicht dienen die Abbildungen Nr. 1 und 3.

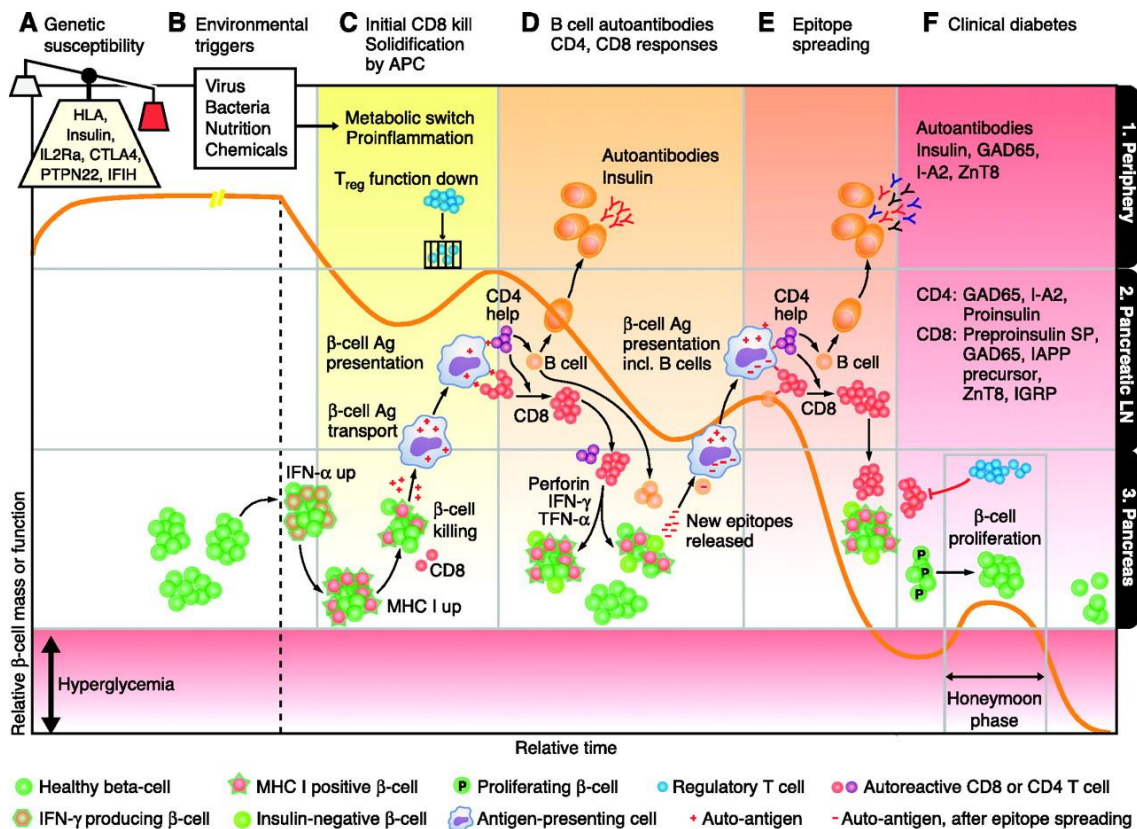


Abbildung 1: Zeitliche Übersicht der pathogenetischen Ereignisse von T1D. Genetische Vulnerabilität sowie Umweltfaktoren führen zu einem proinflammatorischen Milieu im Körper sowie einem vermehrten β -Zell-Zerfall mit verstärkter Antigenpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (A-C). Über verschiedene Schritte kommt es anschließend zuerst CD8- und später CD4-zellvermittelt zur Apoptose von β -Zellen mit einer kontinuierlichen Abnahme der Insulinproduktion (D, E) und schließlich zum manifesten Diabetes (F). (Van Belle et al. 2011. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. Physiological Reviews Vol.91 Nr.1)

1.1.3.1 Autoantigenentstehung und β -Zellvulnerabilität

Wie es zur Aktivierung der Immunreaktion gegen β -Zellen kommt bzw. der Entstehung von Autoantigenen gegen β -Zellen, ist nicht vollständig geklärt.

Bereits 1986 fragten Bottazo et al., ob die Pathogenese der β -Zellen eher als „Mord“ aufgrund externer Faktoren wie einer Virusinfektion oder als „Selbstmord“ aufgrund genetischer Faktoren zu verstehen ist.

Seitdem wurden neue Mechanismen entdeckt, die für die Initiierung der Immunreaktion von Bedeutung sind. So werden eine veränderte Antigenprozessierung durch gewebespezifisches „Splicing“, posttranslationale Modifikation von Epitopen, sowie spezifische Antigenpräsentation an residente antigen-präsentierende Zellen (APCs) in den Langerhans-Inseln mittels Granula und Antigenpolymorphismen [53] als Auslöser diskutiert.

Zudem ist für die Aktivierung und Migration von Immunzellen sowie die β -Zellapoptose ein Milieu von proinflammatorischen Zytokinen, vorrangig Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) von Bedeutung, welches synergistisch von β -Zellen und umliegenden Makrophagen synthetisiert werden kann. Diese Zytokine führen zum Einen zur Migration von APCs in die Langerhans-Inseln, zum Anderen im späteren Verlauf zusammen mit von β -Zellen produzierten Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zum Eintritt von aktivierten T-Zellen in das Pankreas.

Als Auslöser für die Zytokinproduktion werden sowohl extrinsische als auch intrinsische Ursachen diskutiert. So gibt es Anzeichen, dass aufsteigende Infekte aus dem Darm durch Bakterien oder Viren, z.B. Coxsackie B-Viren, β -Zellen direkt oder indirekt schädigen können. Für die Infekthypothese sprechen eine saisonale Verteilung der Erkrankung, sowie das junge Alter bei Erkrankungsbeginn. Zudem gibt es histologische Überschneidungen zwischen Viruserkrankungen des Pankreas und T1D sowie Hinweise auf eine schlechtere virale Clearance von β -Zellen im Vergleich zu α -Zellen [44].

Intrinsische Faktoren beeinflussen ebenfalls die Vulnerabilität der β -Zellen. Aufgrund ihrer Biosynthese und Zellfunktion stellen β -Zellen einen besonderen Zelltyp dar und zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Zellstress ausgelöst durch Vorgänge im endoplasmatischem Retikulum(ER) sowie den Mitochondrien. Durch v.a. chronische,

milde Hyperglykämien, ein proinflammatorisches Zytokinmilieu sowie eine mögliche intrazelluläre Bekämpfung viraler Peptide entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und NO, die zu einer erhöhten Apoptoserate, vermehrter MHC-I-Expression sowie möglicherweise verstärkter Antigen-Expression führen. Hierdurch kommt es zu einer stärkeren Immunantwort sowie verstärktem Stress auf die Zelle, wodurch ein Teufelskreis in Gang gesetzt wird.

Zusammenfassend wird daher heutzutage von einem selbstassistierten Immunzell-vermittelten Mord mit einer aktiven Einbindung der β -Zellen an ihrem eigenen Untergang ausgegangen [57].

1.1.3.2 APCs: Antigenaufnahme , Prozessierung und Migration in pLNs

Damit T-Zellen in Langerhans-Inseln Einwandern können, müssen diese zuerst aktiviert werden und anschließend zu Effektor-T(Teff)-Zellen heranreifen. Dieser Vorgang findet in pankreatischen Lymphknoten (pLNs) statt und benötigt die Präsentation von Autoantigenen durch APCs [58].

Wie beschrieben ist die Freisetzung von Autoantigenen und ihre Präsentation in einer Form, die eine Autoimmunreaktion auslöst, nicht vollständig geklärt.

In Langerhans-Inseln von NOD-Mäusen konnten residente Makrophagen, M2-Makrophagen, identifiziert werden, die im direktem Kontakt mit β -Zellen stehen, sowie eine im Krankheitsverlauf frühe Einwanderung von CD103⁺-dendritischen Zellen (DCs) in das Pankreas, die für die Initiierung von T1D essentiell sind[59].

Mittels Pathogen Recognition Receptors (PRR), wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs), erkennen APCs Antigene und können diese unter inflammatorischen Stimuli phagozytieren. Hierdurch reifen die DCs heran, migrieren mittels Heraufregulierung von Homingrezeptoren in pankreatischen Lymphknoten und prozessieren die phagozytierten Antigene, um diese im Lymphknoten T-Zellen auf ihren MHC-Molekülen präsentieren zu können.

Da T-Zellen nur unter direktem Kontakt mit einem Antigen auf ein Pathogen reagieren können, müssen sie an den Ort gelangen, an dem Antigene vorhanden sind, respektive den pankreatischen Lymphknoten.

Naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt zu einem Antigen hatten, migrieren in die pankreatischen Lymphknoten aus dem Blut über spezifische Endothelzellen, den hochendothelialen Venolen, über eine komplexe Adhäsionskaskade, bestehend aus L-Selektinen, Chemokinen und aktivierten Integrinen. Dieser Vorgang wird auch „Homing“ genannt.

Chemokingesteuert treffen anschließend die gereiften DCs und naiven T-Zellen im Parakortex des pLN aufeinander.

1.1.3.3 Aktivierung und Priming von diabetogenen T-Zellen in pLNs

Die Präsentation von Antigenen durch APCs, vornehmlich DCs, nimmt eine Schlüsselrolle in der Initiierung von T1D ein. Dabei präsentieren DCs nach ihrer Migration in das T-Zell Areal des pLN Autoantigene aus den Langerhans-Inseln an diabetogene T-Zellen unter Produktion von Zytokinen, u.a. Il-1, TNF-a, Il-12.

T-Zellen erkennen ein Antigen über die Bindung ihres T-Zell-Rezeptors (TCR). Damit eine pathogenspezifische Immunantwort möglich ist, besitzt jede T-Zelle einen TCR, der ein spezifisches Antigen, präsentiert als Epitop auf einem MHC-Molekül einer anderen Zelle, erkennt.

Dabei binden CD4⁺-T-Zellen mit ihrem Rezeptor an MHC-II-Moleküle und CD8⁺-Zellen an MHC-I-Moleküle. Dies hat Bedeutung für die Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulären Erregern.

Für T1D wird davon ausgegangen, dass autoreaktive T-Zellen aufgrund einer gestörten zentralen Toleranz aus dem Thymus in die Zirkulation entweichen können[60] und so zur Pathogenese beitragen.

Gelangen diese naiven, sogenannten diabetogenen T-Zellen in die pankreatischen Lymphknoten und treffen hier auf APCs, die ihnen diabetogene Epitope auf MHC-II-Molekülen präsentieren, kommt es zur Bindung und Komplexbildung zwischen TCR und MHC-Molekül und anschließend zur Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen in Teff-Zellen, die anschließend in das Pankreas einwandern können. Dieser Vorgang wird auch als „Priming“ bezeichnet.

Neben dieser Bindung, die an späterer Stelle genauer beschrieben wird, muss von der T-Zelle unterscheiden werden, ob das präsentierte Antigen ein Pathogen darstellt. Dieser weitere Schritt der Selbsttoleranz wird per Kostimulator-Signal über die Bindung von reifen DCs mittels CD80 oder CD86, auch B7 bezeichnet, an CD28 auf der Oberfläche der naiven T-Zellen vermittelt. Hierdurch kommt es zur verstärkten Il-2 Produktion in den T-Zellen und somit zur Aktivierung und Reifung der naiven T-Zellen zu Teff-Zellen [61].

CD4⁺-Effektor-Zellen, auch T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) genannt, können sich in verschiedene Subtypen differenzieren, wobei die am detailliertesten beschriebenen Th1-, Th2- und Th17-Zellen darstellen. Dabei wird der Subtyp über die Zytokinproduktion sowie typische Transkriptionsmarker definiert.

Die Entscheidung, in welche Art von Th-Zelle sich eine naive T-Zelle entwickelt, wird determiniert durch die APC, mit welcher die naive T-Zelle einen Komplex bildet, sowie umliegender T-Zellen, die bereits differenziert sind oder sich im Prozess dorthin befinden. Diese Zellen produzieren Zytokine, welche Einfluss auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in den T-Zellen besitzen [62]. Je nach Differenzierung produzieren die APCs eine andere Zusammensetzung an Zytokinen (Siehe Abb. 2). Diese Zusammensetzung wird festgelegt durch Faktoren und Stimuli, die die APC während der Phagozytose des Antigens in den Langerhans-Inseln erfahren hat.

Für T1D ist nicht abschließend geklärt, welcher bzw. ob nur ein Th-Subtyp für die Erkrankung verantwortlich ist. Zur Zeit als nur Th1- und Th2-Zellen bekannt waren, bestand das Paradigma, dass T1D eine Th1-vermittelte Erkrankung ist, welches sich später zu einem Einfluss beider Zelltypen auf die Erkrankung änderte [63, 64]. Nach Entdeckung der Th17-Zellen, rückten diese ebenfalls in den Fokus der Forschung [65].

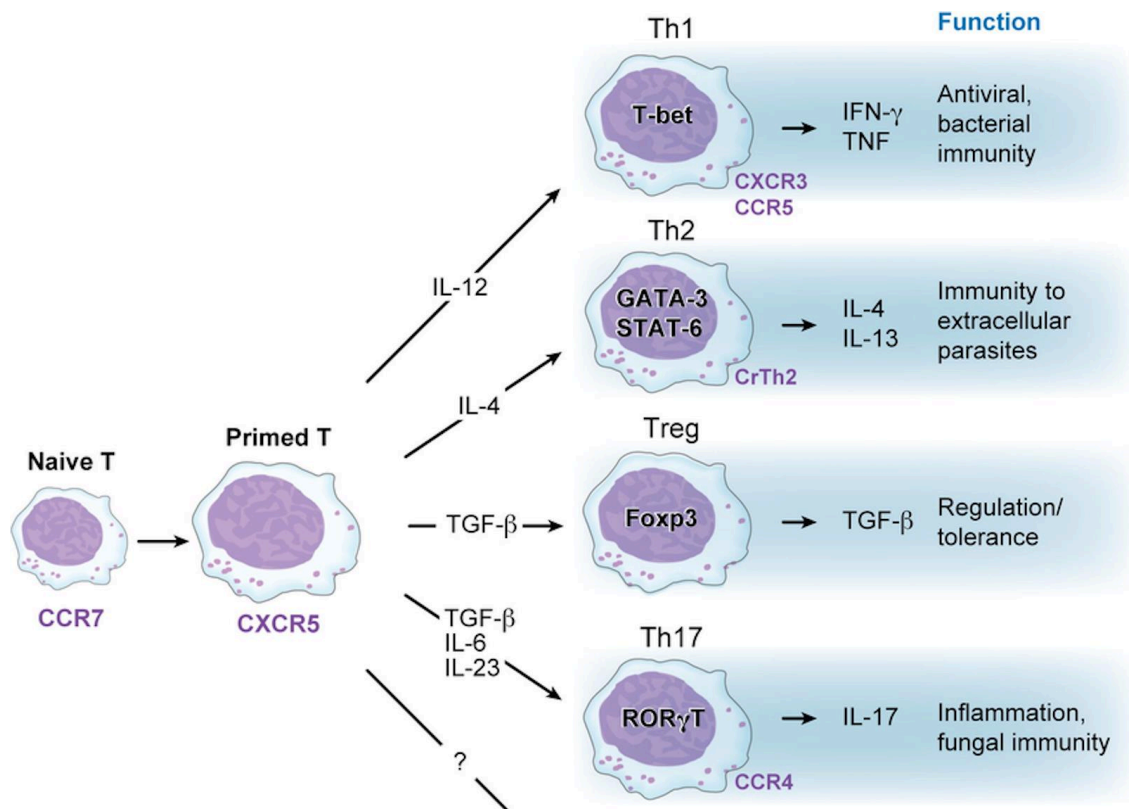


Abbildung 2: Differenzierung von naiven T-Zellen. Je nach vorliegendem Zytokinmuster entwickeln sich die geprimten T-Zellen in unterschiedliche Subtypen. Diese werden über die Expressierung spezifischer Transkriptionsfaktoren sowie Zytokinproduktion definiert. Diese Differenzierung ist von Bedeutung, um auf Pathogene spezifisch reagieren zu können. In lila dargestellt sind ebenfalls die exprimierten Chemokinrezeptoren, die Bedeutung für die Migrationseigenschaften der Zellen haben. (Abgewandelt von King et al. 2008. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. Annu Rev Immunol. 26:741-66)

In adoptiven T-Zell-Transferversuchen mit NOD-Mäusen wurde gezeigt, dass T1D alleine durch diabetogene CD4⁺-Zellen ohne CD8⁺-Zellen ausgelöst werden konnte. Dabei waren Th1-Zellen, jedoch nicht Th2-Zellen, im Stande einen manifesten Diabetes zu vermitteln. Ebenfalls entwickeln NOD-Mäuse ohne STAT4 oder T-bet [66], beides Transkriptionsfaktoren für Th1-Zellen, keinen T1D. Zudem ist ein beschleunigter Krankheitsverlauf zu erkennen, wenn NOD-Mäusen exogenes Il-12 appliziert wird [67], welches als Promoter für Th1-Differenzierung und IFN- γ -Antwort gilt.

IFN- γ , das auch als Marker-Zytokin von Th1-Zellen genutzt wird, ist ebenfalls mit T1D assoziiert. So lindert die Blockade von IFN- γ durch lösliche nicht-immunologische IFN- γ -Rezeptoren den Krankheitsverlauf von T1D.

Es gibt jedoch auch Anzeichen dafür, dass IFN- γ nicht essentiell für T1D ist. So führte in NOD-Mäusen der Verlust des IFN- γ -Rezeptors zu einer verspäteten Krankheitsentwicklung mit vermehrter Th2-Differenzierung, aber nicht zum Schutz vor T1D [68].

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass Th1-Zellen und IFN- γ zwar einen deutlichen Einfluss auf die Pathogenese von T1D haben, jedoch wohl nicht entscheidend für die Krankheitsentstehung sind.

Mit der Entdeckung von Th-17 Zellen [69] sowie der Feststellung, dass exogene Applikation von Il-17 und Il-25 NOD-Mäuse vor T1D schützt [70], rückte dieser Zelltyp in den Fokus der T1D-Forschung.

Im peripheren Blut von T1D-Patienten konnten erhöhte Konzentrationen von Il-17 und Il-21 nachgewiesen werden [71], beides von Th17-Zellen produzierte Zytokine.

Dabei bleibt jedoch offen, welchen Einfluss Th17-Zellen auf die Erkrankung besitzen. So wird durch Studien bezüglich Il-17A sowohl ein protektiver [72] als auch pathogener [73, 74] Effekt suggeriert.

Umgekehrt zeigte Il-17A-Silencing in NOD-Mäusen durch Inhibierung der Il-17A-Expression keinen protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf [75].

Dies lässt darauf schließen, dass Il-17 nicht entscheidend für die Pathogenese ist. So konnten Th17-Zellen in Transferversuchen mit NOD-Mäusen zwar T1D auslösen, jedoch erst nach Konversion in IFN- γ -produzierende Th17-Zellen [76, 77]. Dies zeigt, dass Th17-Zellen eine gewisse Plastizität aufweisen, die in Anbetracht der Befunde aus anderen Studien bedacht werden muss.

Neben Il-17 produzieren Th17-Zellen weitere Zytokine, unter anderem Il-21, das in verschiedenen Studien mit T1D in Assoziation gebracht wurde [65] und für die Pathogenese im späteren Verlauf bedeutsam zu sein scheint. Eine klare Bedeutung für Th17-Zellen in der Pathogenese von T1D bleibt daher weiterhin offen.

1.1.3.4 Migration von autoreaktiven T-Zellen in Langerhans-Inseln

Nach Priming und erfolgter Teff-Differenzierung kommt es zur Migration der autoreaktiven T-Zellen in die Langerhans-Inseln.

Dieser Schritt wird erst durch die Expression von Liganden für E-Selektin ermöglicht, die eine Bindung von T-Zellen an Endothelzellen außerhalb von sekundären lymphatischen Organen erlauben. Dies geschieht z.B. während der Th1-Differenzierung, vermittelt durch Il-12, das von APCs synthetisiert wird. Dementsprechend sind naive T-Zellen hierzu nicht in der Lage, was die Reifung zu Teff-Zellen in pLNs substanziell für die Krankheitsentstehung macht [58].

Gezielte Migration von Leukozyten wird über Chemokine ermöglicht, die von verschiedenen Zellen im Zielgewebe synthetisiert werden. Zellen, die rezeptorvermittelt Chemokine erkennen, können entlang von Konzentrationsgradienten zur Quelle der Chemokinsekretion migrieren [78, 79]. Dieser Vorgang wird auch „Chemotaxis“ genannt.

Zytokine, die für die Differenzierung von naiven T-Zellen verantwortlich sind, kontrollieren das anschließende Chemokinrezeptor-Profil der Teff-Zelle [80]. Dabei kommt der Chemokinrezeptor CXCR3 vor allem auf Th1-Zellen vor [81, 82]. Bei Mäusen sind drei Liganden für CXCR3 identifiziert worden. Dies sind CXCL9, CXCL10 und CXCL11, deren Expression durch Interferone, v.a. IFN- γ , induziert wird [83, 84].

β -Zellen, die proinflammatorischen Zytokinen, wie Il-1 β , IFN- γ und TNF- α , ausgesetzt sind, regulieren Transkriptionsfaktoren vor allem für CXCL10, aber auch CXCL9 und weitere inflammatorische Chemokine herauf. Dies führt zur Infiltration der Langerhans-Inseln mit T-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen. Das stärkste Migrationssignal für diese Zellen wird durch CXCL10 vermittelt, wobei die anschließende Chemotaxis in die Langerhans-Inseln abhängig von der CXCR3-Expression auf diesen Zellen ist. So führt z.B. eine fehlende Expression von CXCR3 in NOD-Mäusen zum verspäteten Einsetzen von Insulinitis, den entzündlichen Vorgängen innerhalb der Langerhans-Inseln, sowie T1D [85].

Dies unterstreicht die Stellung chemotaktisch-vermittelter Migration von Th-Zellen in der Pathogenese von T1D. Von besonderer Bedeutung ist dabei das Zytokinmilieu, das zur Produktion von CXCR3-spezifischen Chemokinen in β -Zellen führt und so Effektor-Zellen, vor allem Th1-Zellen, in die Langerhans-Zellen dirigiert.

1.1.3.5 Insulinitis

T1D wird charakterisiert durch eine progressive Infiltration der Langerhans-Inseln durch Zellen des Immunsystems, insbesondere von Makrophagen und CD8⁺-T-Zellen. Dieser Vorgang wird auch als Insulinitis bezeichnet. Dabei wird eine benigne, nicht-destruktive Form von einer destruktiven Form unterschieden, in der es zur β -Zellzerstörung kommt. Zwischen NOD-Maus und Mensch bestehen dabei neben Geschlechterverteilung sowie Beginn und zeitlichem Verlauf der Erkrankung auch Unterschiede in der Histologie. So tritt beim Menschen die Insulinitis lobulär und in kleinerer Anzahl der Langerhans-Inseln auf als in der NOD-Maus.

T-Zellen wird eine entscheidende Rolle im Erkrankungsprozess beigemessen und sind letztendlich direkt und indirekt für den Untergang der β -Zellen verantwortlich. Untersuchungen an Pankreata von T1D-Patienten zeigten v.a. Makrophagen und CD8⁺-Zellen sowie zu einem kleineren Anteil CD4⁺- und B-Zellen in den Langerhans-Infiltraten [86].

Bezüglich der Bedeutung von T-Zellen für die Pathogenese von T1D konnte in Tierversuchen eine absolute Notwendigkeit für das Vorliegen von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen für die Entwicklung von spontanem T1D nachgewiesen werden [87-89] ebenso wie eine Beschleunigung bzw. einen Schutz vor T1D durch Transfer- bzw. Eliminierungsversuche mit CD4⁺- und CD8⁺-Zellen [26]. Untersuchungen an Pankreata von T1D-Patienten und NOD-Mäusen haben gezeigt, dass CD8⁺-Zellen - auch zytotoxische T-Zellen (CTL) genannt - die häufigste Zellart in den infiltrierten Langerhans-Inseln darstellen [90]. CD8⁺-T-Zellen vermitteln einen Schutz gegenüber intrazellulären Bakterien, sowie vor Virus- und Tumorerkrankungen durch CTL-eff-Gedächtniszellen.

In NOD-Mäusen und Menschen gibt es Hinweise darauf, dass die Zerstörung von β -Zellen über MHC-I-Bindung vermittelt wird. Da β -Zellen nur MHC-I-Moleküle exprimieren und diese im Krankheitsverlauf auf β -Zellen hochreguliert werden, wird CD8⁺-Zellen – in Zusammenschau mit dem hohen Anteil an CTLs im Infiltrat - daher ein hohes pathogenes Potential für T1D beigemessen.

Die pathogenetische Bedeutung der CTLs wird ebenfalls durch Befunde aus dem peripheren Blut von T1D-Patienten nach Pankreastransplantation untermauert. Hier konnte das Vorkommen von diabetogenen $CD8^+$ -Zellen im peripheren Blut als prädiktiver Marker für den Krankheitsverlauf identifiziert werden [91]. Ebenfalls korrelierte die Konzentration der CTLs im Blut mit dem Grad der β -Zelldestruktion [92]. Die diabetogenen $CD8^+$ -Zellen reagieren auf Epitope, die v.a. von β -Zell-Antigenen stammen. Untersuchungen an der „network for pancreatic organ donors with diabetes“ (nPOD)-Studie haben dabei autoreaktive $CD8^+$ -T-Zellen in Langerhans-Inseln mit Spezifität für Präproinsulin(PPI), Insulin, IGRP, GAD65, preproislet amyloid protein, und IA-2 identifiziert.

Isolierte autoreaktive CTLs produzierten unter Präsentation von Insulin B10-18-Peptid IFN- γ als weiteres Zeichen der diabetogenen Spezifität. In Versuchen mit PPI-reaktiven $CD8^+$ -Zellen zeigte sich zudem eine vom Blutzuckerspiegel abhängige β -Zellzytotoxizität als weiterer Hinweis für die Bedeutung metabolischen Stresses in der Pathogenese von T1D [93].

Der CTL-vermittelte Insult der β -Zellen geschieht dabei durch direkte Zytotoxizität, am ehesten nach MHC-I-Bindung. Granzymen, v.a. Granzym B, in Abhängigkeit von Perforin wird bei diesem Prozess ein großer Wert beigemessen. Dagegen zeigt der Fas-FasL-Signalweg eher geringe Bedeutung für die Apoptoseinduktion.

Des Weiteren können CTL-Zellen Zytokine wie IFN- γ , TNF α , IL-1 β und NO sowie inflammatorische Chemokine synthetisieren und somit zusätzlich einen direkten und indirekten Effekt auf die β -Zellzytotoxizität ausüben.

Obwohl $CD4^+$ -Zellen nur einen geringen Anteil des Inselzell-Infiltrats ausmachen [86], zeigt die hohe genetische Suszeptibilität von MHC-II-Polymorphismen, wie der DR3-DQ2 DR4-DQ8 Haplotyp bzw. der durch andere MHC-II-Haplotypen vermittelte Schutz vor T1D, dass $CD4^+$ -Zellen in die Pathogenese involviert sind. So stellt der Verlust der Selbsttoleranz von $CD4^+$ -Zellen gegenüber β -Zell-Antigenen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle für die Erkrankung dar. Ebenfalls ist das $CD4/CD8$ -Zellverhältnis in T1D-Patienten verändert und eine erhöhte Anzahl an $CD4^+$ -Zellen im Blut ist mit einer erhöhten Krankheitsaktivität assoziiert.

Wie CD4⁺-Zellen zur Pathogenese von T1D beitragen ist nicht vollständig geklärt. CD4⁺-Zellen sind von Bedeutung für die zelluläre Immunantwort und Aktivierung von CD8⁺- und B-Zellen und stehen daher als Koordinatoren im Zentrum der Immunreaktion auf β -Zellen. CD4⁺-Zellen können über direkten Zellkontakt und Fas-FasL-Bindung β -Zellapoptose einleiten, benötigen im Transferversuch jedoch Makrophagen zur T1D-Induktion. Womöglich liegt daher eine CD4-Zell-vermittelte Aktivierung von Makrophagen vor. Eine Schädigung der β -Zellen wird folglich über eine direkte toxische Wirkung der Makrophagen, z.B. durch ROS, ausgelöst. Daher wird eher von einer indirekten diabetogenen Wirkung von Th-Zellen im Pankreas ausgegangen. Dieser indirekte Effekt auf den β -Zelltod erklärt sich dadurch, dass β -Zellen zum Einen keine MHC-II-Moleküle exprimieren und zum Anderen, dass die von Th-Zellen produzierten Zytokine wohl nicht direkt zytotoxisch auf β -Zellen wirken, sondern die Migration, Aktivierung und Kommunikation anderer Immunzellen fördern. So kann z.B. IFN- γ über eine Vielzahl von Wegen zum Krankheitsprozess beitragen, u.a. durch eine verstärkte Expression von MHC-I-Molekülen auf β -Zellen und Aktivierung von CD8⁺-Zellen, einer Hochregulierung von MHC-II-Molekülen auf CD11b⁺-Zellen, wie Makrophagen, und ihrer anschließenden Aktivierung sowie einer verstärkten Leukozyten-Extravasation in das Gewebe durch die Induzierung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen [94].

Zytokine sind somit in der T1D-Pathogenese als wichtige Immunregulatoren anzusehen, aber wohl nicht entscheidend für den β -Zelltod. Des Weiteren scheint erst das Zusammenspiel mehrerer Zytokine für T1D von Bedeutung zu sein. Durch die Überexpression von SOCS1 in β -Zellen können mehrere Zytokinsignalwege geblockt werden, u.a. IFN- γ , was einen deutlich stärkeren Einfluss auf CD8⁺-vermittelten Diabetes hatte als die Aufhebung einzelner Zytokine. Somit schützt nur die Aufhebung des systemischen Zytokin-Signaling auf β -Zellen vor Diabetes.

Zusammenfassend ist der genaue Wirkmechanismus von CD4⁺-T-Zellen weiterhin schwer einzuschätzen, da aufgrund der alleinigen MHC-I-Expression von β -Zellen keine direkte Zell-Zell-Interaktion mit CD4⁺-Zellen möglich erscheint. Eine indirekte

Wirkung der CD4⁺-Zellen über die Beeinflussung weiterer Zellen in den Langerhans-Inseln sowie Zytokin-vermittelte Effekte auf β -Zellen gilt daher als wahrscheinlich. Dabei ist nicht gänzlich geklärt, woher einige der Zytokine stammen, da β -Zellen sowie Zellen des angeborenen Immunsystems proinflammatorische Zytokine und inflammatorische Chemokine produzieren können, die direkt und indirekt die β -Zellen schädigen.

Neben CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen wurden weitere Immunzellen in Pankreata von T1D-Patienten identifiziert [86]. Zusammen mit residenten Zellen bilden diese eine Umgebung, welche die Proliferation und Funktion von T-Zellen unterstützen, sowie direkt pathogen auf β -Zellen wirken können.

Obwohl T1D als T-Zell-vermittelte Erkrankung aufgefasst wird, haben B-Zellen ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Erkrankung. So zeigte der Einsatz von Anti-CD20-Antikörpern einen verlangsamten Krankheitsverlauf in NOD-Mäusen und neu diagnostizierten T1D-Patienten [95]. Autoantikörper-Produktion gegen β -Zellantigene kann bereits in prädiabetischen und neudiagnostizierten Individuen nachgewiesen werden [96]. Zudem sind Antikörper gegen Insulin, GAD, Zinktransport 8 (ZnT8) und Tyrosin-Phosphatase (IA-2) Prädiktoren für T1D und verlässliche Marker im Krankheitsverlauf [97]. Des Weiteren sind Individuen, die ein diabetogenes B-Zellrepertoire aufweisen einem erhöhten Krankheitsrisiko ausgesetzt. Dabei wird vermutet, dass die pathogene Wirkung nicht humoraler Art ist, sondern über Antigenpräsentation in pLNs und im Pankreas das Überleben und die Proliferation von CD4⁺- sowie CD8⁺-Zellen sichern [98-101] sowie über die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Einfluss auf die Monozyteninfiltration den Krankheitsprozess unterstützen. Da Agammaglobulinämie nicht vor T1D schützt [102], kann davon ausgegangen werden, dass B-Zellen zwar eine unterstützende Zellart im Krankheitsverlauf darstellen, aber nicht essentiell für die Pathogenese von T1D im Menschen sind.

Wie Transferversuche mit CD4⁺-Zellen gezeigt haben, werden Makrophagen für die Induktion von T1D benötigt. Dies weist auf eine CD4-vermittelte Aktivierung der Makrophagen hin. Zudem zeigen histologische Untersuchungen, dass Makrophagen in

naher Lokalisation zu β -Zellen vorkommen und NOD-Mäuse spezifische, residente Makrophagen besitzen, die im engen Antigenaustausch mit β -Zellen stehen [59]. Des Weiteren weisen aktivierte Makrophagen aus Insulitisinfiltraten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zytotoxische Effekte auf β -Zellen auf [103]. Der pathologische Mechanismus über den Makrophagen auf β -Zellen wirken, ist dabei nicht genau geklärt. Neben direkter Phagozytose [104] sind Makrophagen eine wichtige Quelle für Zytokine wie $IL-1\beta$ und $TNF-\alpha$, NO und ROS und können so ebenfalls indirekt β -Zellen schädigen.

Neben diesen Zellen können weitere Mediatoren zur Pathogenese von T1D beitragen. Natürliche Killer (NK)-Zellen weisen als Vertreter des angeborenen Immunsystems eine MHC-I-vermittelte Zytotoxizität ohne vorheriges Priming auf. Dabei liegen keine Hinweise für direkte zytotoxische Effekte vor. Im initialen proinflammatorischen Prozess wird durch Zytokinproduktion, z.B. $IFN-\gamma$, ein proinflammatorisches Umfeld erzeugt und so eine parakrine Wirkung auf andere Zellen.

Die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) gehört zu den Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs), die durch hochkonservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) ein breites Spektrum an Mikroorganismen erkennen können. Diese Rezeptoren kommen in Zellen des Immunsystems, v.a. des angeborenen Immunsystems, sowie in Epithelzellen vor. Inselzellen exprimieren ebenfalls TLRs. Über die Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es zu vermehrter Ausschüttung von proinflammatorischen Chemokinen wie CXCL-10, die T-Zellen, DCs und Makrophagen in die Langerhans-Inseln migrieren lassen. Apoptotische β -Zellen in NOD-Mäusen können zudem TLR-vermittelt APC-adaptive Immunzellen aktivieren und hierdurch wiederum zum Priming autoreaktiver $CD4^+$ -Zellen beitragen. Es besteht ebenfalls der Verdacht, dass die TLR-vermittelte angeborene Immunantwort zur T1D-Induktion in NOD-Mäusen beitragen könnte [105]. Weiterhin wird die virusinduzierte β -Zellapoptose über TLR-Aktivierung gesteuert. DCs in neu erkrankten Individuen könnten ebenfalls veränderte TLR-Signalwege aufweisen, die mit erhöhten proinflammatorischen Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Serum korrelieren.

Dies zeigt, dass für die Initiierung und Aktivierung weiterer Immunzellen in der T1D-Pathogenese auch das angeborene Immunsystem und gerade TLR-assoziierte Signalwege von Bedeutung sein könnten.

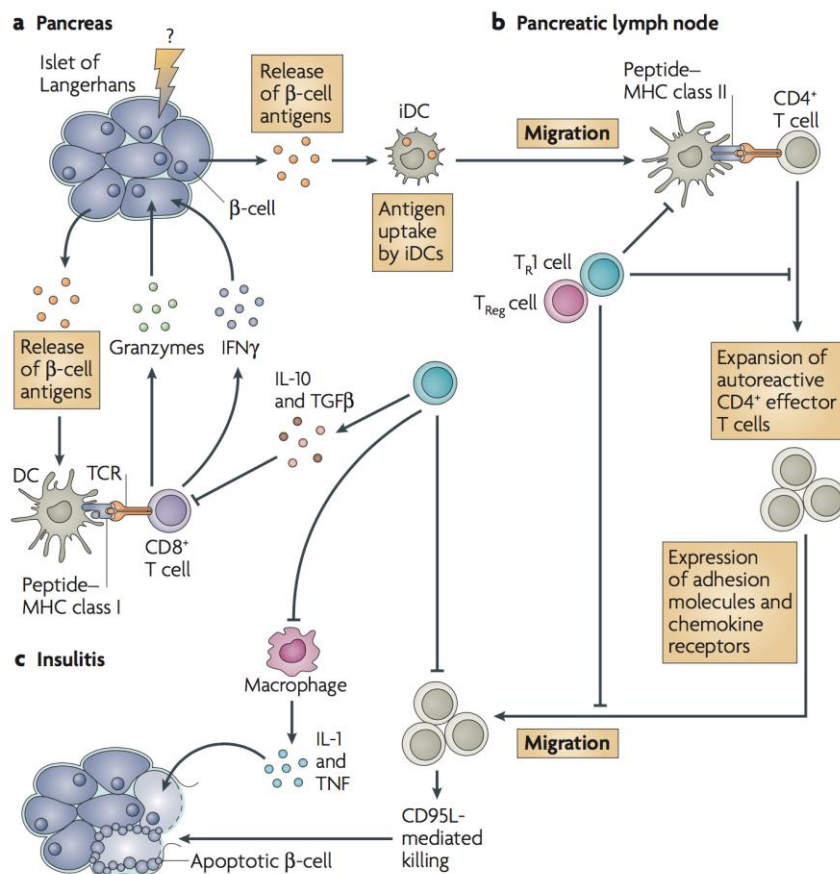


Abbildung 3: Darstellung der Pathogenese von T1D. a) Zellstress bedingt die Freisetzung von β -Zellantigenen, welche von APCs aufgenommen werden. b) APCs wandern in die pankreatischen Lymphknoten ab und vermitteln die Expansion und Differenzierung naiver T-Zellen zu Th-Zellen. Über die Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren können diese in das Pankreas einwandern und führen so zu Insulinitis. a/c) $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen tragen neben Makrophagen zur β -Zellzerstörung bei. Dieser Prozess wird von APCs im Pankreas unterstützt. Treg-Zellen können auf verschiedenen Ebenen in diesen Prozess eingreifen und so die Immunantwort negativ regulieren. (Roncarolo und Battaglia. 2007. Pathogenesis of type 1 diabetes and control by regulatory T cells. Nature Reviews Immunology 7)

1.1.3.6 Gestörte periphere Immuntoleranz

Entweichen diabetogene T-Zellen der zentralen Immuntoleranz im Thymus können weitere Vorgänge zur Inhibierung dieser Zellen beitragen. Diese Vorgänge werden auch als „periphere Immuntoleranz“ bezeichnet. Einen zentralen Vermittler der peripheren Toleranz stellen regulatorische T (Treg)-Zellen dar. Treg-Zellen unterdrücken die Immunantwort auf körpereigene und körperfremde Antigene und vermitteln so eine

Immunhomöostase zur Unterbindung einer überschießenden Immunantwort. Die Teff-Zellantwort kann dabei sowohl über Zellkontakte, möglicherweise CTLA-4-vermittelt, als auch durch lösliche Mediatoren wie anti-inflammatorische Zytokine, z.B. TGF- β und IL-10, inhibiert werden. Ein Marker für Treg-Zellen ist unter anderem der Transkriptionsfaktor FoxP3, welcher für die Entwicklung, Erhaltung und suppressive Funktion von Treg-Zellen von Bedeutung ist [106].

Für T1D wird neben einer erhöhten β -Zellvulnerabilität und einer verstärkten autoreaktiven Immunantwort auch von einer gestörten Immuntoleranz als Teil der Pathogenese ausgegangen. Treg-Zellen finden sich bereits in entzündeten Pankreasinseln. Infiltrate von Langerhans-Inseln weisen in NOD-Mäusen hohe Anteile an Foxp3⁺-Treg-Zellen auf. Zudem sind Signale für die Proliferation und das Überleben von Treg-Zellen in diesem Gewebe erhöht. Dies lässt einen aktiven Versuch des Körpers vermuten, die Entzündungsreaktion in den Langerhans-Inseln zu regulieren. In NOD-Mäusen verfügen Treg-Zellen über einen eher schwachen Einfluss auf die T-Zell-Expansion und wirken vorwiegend negativ auf die Differenzierung und Expression von CXCR3 in CD4-Zellen ein über eine Verminderung der IFN- γ -Produktion. Hierdurch wird die Gewebeinfiltration von Teff-Zellen ins Pankreas eingeschränkt [107].

Wodurch die gestörte periphere Immuntoleranz in T1D ausgelöst wird, ist nicht vollständig geklärt. Es wurde berichtet, dass NOD-Mäuse eine verminderte Treg- zu Teff-Zell-Ratio in Langerhans-Inseln im Insulitis-Stadium aufweisen [108]. Dies wird mit einer verstärkten Apoptose von Treg-Zellen durch verminderte IL-2-Level und Bcl2-Signaltransduktion erklärt, womöglich durch einen Defekt in Teff-Zellen. Andere Studien geben eine verminderte Treg-Zellfunktion bei normaler Treg-Anzahl an, verbunden mit der Annahme, dass eingeschränkte suppressive Eigenschaften über eine schlechtere Treg-Funktion sowie vermehrte Teff-Anzahl zum Progress der Erkrankung beitragen.

Zusätzlich liegen Anzeichen vor, dass die gestörte Immunhomöostase auf veränderte Eigenschaften der Teff-Zellen zurückzuführen ist [109-111].

1.1.3.7 Post-Insulitis-Stadium

Willcox et al. konnten anhand der nPOD-Studien an T1D-Patienten zeigen, dass sich die Anzahl aller Immunzellen in den Langerhans-Inseln drastisch vermindert, nachdem diese Insulin-defizitär werden [86]. Trotz dessen sind in T1D-Patienten selbst 50 Jahre nach Krankheitsbeginn weiterhin Insulin⁺- β -Zellen nachweisbar[112]. Dies ist kongruent mit Befunden von langjährigen T1D-Patienten, die weiterhin C-Peptid im peripheren Blut aufweisen [113]. Histologisch können trotz deutlich gesunkener Anzahl an Immunzellen weiterhin entzündliche Infiltrate in Langerhans-Inseln nachgewiesen werden bzw. finden sich Glucagon⁺- und Somatostatin⁺-„Pseudo-Inseln“.

Aufgrund des Nachweises von GAD65⁺- und Preproinsulin⁺- Teff-Gedächtniszellen im Blut von T1D-Patienten wird angenommen, dass diese Zellen aus dem Pankreas abwandern und als zentrale Gedächtniszellen in Blut und Lymphe zirkulieren. Dabei stellt die Milz den Ort der höchsten Dichte an Teff-Zellen dar[114].

Zusammenfassend ist die Pathogenese des T1D komplex und wird durch genetische Risikofaktoren sowie Umweltfaktoren bestimmt, die zu einer erhöhten Vulnerabilität von β -Zellen, einem autoreaktiven Immunsystem und einer gestörten Immunhomöostase führen.

1.2 PTPN22

1.2.1 Einleitung

Die Protein Tyrosin Phosphatase Nicht-Rezeptortyp (PTPN)22 wird durch das gleichnamige Gen, *ptpn22*, auf Chromosom 1 kodiert. Das Enzym wird in allen hämatopoetischen Zellen exprimiert und liegt löslich im Zytoplasma vor. In Menschen wird es auch als „lymphoid tyrosine phosphatase“ (LYP) und in Mäusen als „PEST domain-enriched tyrosine phosphatase“ (PEP) bezeichnet [115]. Aufgrund der Relevanz für diese Arbeit soll die Bedeutung von PTPN22 und des Risikoallels *Lyp-620W* auf die T-Zell-Rezeptor(TCR)-Signalkaskade nachfolgend genauer beschrieben werden.

1.2.2 Die TCR-Signalkaskade und ihre Beeinflussung durch PTPN22

Der TCR-Komplex wird von allen T-Zellen exprimiert und vermittelt die Erkennung MHC-assoziiierter Antigene. Nach Bindung eines passenden Antigens wird durch Konformationsänderung des Rezeptors und durch unterschiedliche, intrazelluläre Enzyme, u.a. Tyrosinkinasen der Src-Familie und ZAP-70, eine Signalkaskade initiiert, die schließlich zum Zellkern gelangt und so den Einstieg in den Zellzyklus, die Differenzierung von naiven zu Effektor-T-Zellen sowie deren Überleben (z.B. als rezirkulierende Gedächtnis-T-Zelle) steuert [116] (Siehe Abb. 4). Die Stärke und Dauer der Antigenbindung sowie das extrazelluläre Zytokinmilieu entscheiden dabei über die Art der Zellreaktion. Bei der Signalweiterleitung zum Zellkern stellt die Ebene kurz unterhalb des TCR eine wichtige Determinante dar. Aus diesem Grund erweist sich die Regulierung der proximalen TCR-Signalkaskade von großer Bedeutung für die korrekte Immunantwort [117]. Intrazellulär führt bereits die Aktivierung der Kinasen der Src-Familie, wie z.B. Fyn, zur Gegenregulierung durch Adaptermoleküle sowie Enzyme - u.A. Csk, einer Kinase, die negative regulatorische Effekte auf die proximale TCR-Signalkaskade besitzt [118]. Dabei stellen die Anzahl der negativen Regulatoren sowie deren Funktion und Aktivität eine entscheidende Rolle für die Signalweiterleitung in den Zellkern und somit die weitere Entwicklung und das Schicksal der Zelle dar.

Matthews et al. konnten auf der Suche nach neuen Inhibitoren des TCR-Signalwegs 1992 eine Phosphatase mit mehreren Prolin-reichen Domänen identifizieren, die nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und später als PTPN22 bekannt wurde [119]. Mehrere Studien, die sich mit möglichen Substraten von PTPN22 beschäftigten, konnten LCK, ZAP-70, CD3 ζ -Kette, VAV, CD3 ϵ und VCP als solche identifizieren [120] und PTPN22 als negativen Regulator der proximalen TCR-Signalkaskade charakterisieren [121].

PTPN22 kommt im Zytoplasma gebunden an Csk vor, wobei das Prolin-reiche, nicht katalytische C-terminale Ende als Ligand der SH3-Domäne von Csk [122] fungiert. Aufgrund der sehr spezifischen Bindung und essentiellen Bedeutung der SH2- und SH3-Domäne für die Funktion von Csk wurde angenommen, dass Csk und PTPN22 über diese Bindung synergistisch wirken [122, 123].

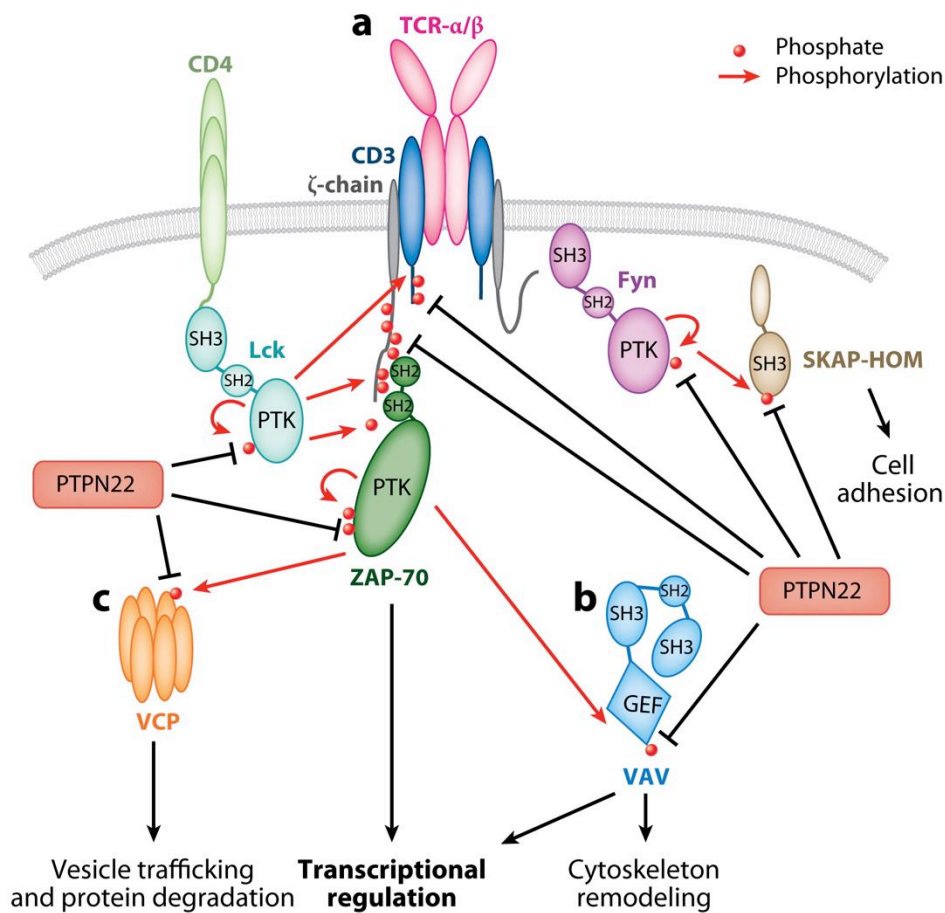


Abbildung 4: PTPN22 ist ein negativer Regulator der proximalen Signalkaskade des TCRs in CD4⁺-Zellen. Über das Einwirken auf unterschiedliche Signalkaskaden kann die Zellaktivierung von T-Zellen nach Antigenbindung am TCR deutlich beeinflusst werden. Rote Pfeile: Phosphorylierung und Aktivierung, schwarze Linien mit Balken: Dephosphorylierung und Deaktivierung des Enzyms. (Bottini und Peterson. 2014. Tyrosine phosphatase PTPN22: multifunctional regulator of immune signaling, development, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 32)

1.2.3 PTPN22 und Autoimmunität

Der Einsatz von GWAS konnte Anfang der 2000er Jahre neue genetische Polymorphismen identifizieren, die im Zusammenhang mit T1D standen. Hierunter fiel auch die Entdeckung einer Einzelnukleotid-Polymorphie, im Englischen Single-Nucleotide Polymorphism (SNP), für *ptpn22* durch Bottini et al. 2004, die mit einem erhöhten Risiko für T1D verbunden war [124]. Zusätzlich konnten Assoziationen dieses SNP zu anderen Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, SLE, Morbus

Basedow und Vitiligo identifiziert werden [125]. Ein Basenaustausch von Zystein durch Thyrosin an Stelle 1858 führt zur Kodierung der Aminosäure Tryptophan an Position 620 anstatt Arginin (R620W). Hierdurch kommt es zu einem veränderten Bindungsverhalten von PTPN22 an Csk, was dazu führt, dass PTPN22 zur Zellmembran gelangen und hier enzymatisch wirksam sein kann. Dieser Befund führte zur Revidierung der Annahme, dass PTPN22 synergistisch mit Csk wirkt [126]. Jedoch bestehen sowohl bezüglich der Bindungseigenschaften von PTPN22-R620W sowie der hieraus resultierenden Wirkung verschiedene Theorien, die noch nicht abschließend geklärt wurden [115].

Obwohl zu Beginn der Entdeckung von *ptpn22* als Suszeptibilitätsallel für Autoimmunerkrankung davon ausgegangen wurde, dass das Risikoallel *ptpn22*W* entweder als eine generelle „gain-of-function“- oder „loss-of-function“-Variante agiert, stellt sich die Funktion der Kinase und ihrer genetischen Varianten in murinen Knockdown- und Knockin-Versuchen sowie in gesunden Trägern bzw. T1D-Patienten als sehr viel komplexer dar [127]. Daher wird heutzutage vermutet, dass PTPN22 verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen aufweist und Variationen des Gens je Zelltyp zu unterschiedlichen Auswirkungen führen. Diese komplexen Regelmechanismen sind in verschiedenen Übersichtsarbeiten [128, 129] anschaulich zusammengefasst worden und würden in ihrer vollständigen Darstellung den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

In Genexpressionsstudien konnte determiniert werden, dass PTPN22 in B-Zellen, T-Zellen, DCs und Monozyten exprimiert wird. Dabei unterschied sich die Menge an exprimierten PTPN22 zwischen den Zellarten deutlich [127]. Um die verschiedenen Einflüsse von PTPN22 und des Risikoallels *ptpn22*W* auf diese Zellen untersuchen zu können, wurden humane Zellen sowie solche von transgenetisch veränderten Mäusen untersucht.

Da ZAP-70, ein Substrat von PTPN22, in die Selektion von T-Zellen im Thymus involviert ist, wird angenommen, dass PTPN22 einen Einfluss auf die zentrale Toleranz und die Entstehung autoreaktiver T-Zellen hat [120, 130].

In Mausmodellen stellt sich jedoch ein unklares Bild des Effekts von PTPN22 auf die zentrale Immuntoleranz dar. So führt der Knockout von *ptpn22* in gesunden C57BL/6-Mäusen zu einer verstärkten positiven Selektion [131] und ein R619W-Knockin zu einer leicht erhöhten positiven und negativen Selektion [132, 133]. Ein *ptpn22*-Knockdown in NOD-Mäusen konnte jedoch keinen Effekt auf die negative Selektion im Thymus nachweisen. Da Untersuchungen bezüglich der zentralen Immuntoleranz in menschlichen Trägern von Lyp-620W nicht vorliegen, bleibt offen, in welchem Ausmaß Mutationen von *ptpn22* die Entstehung autoreaktiver T-Zellen beeinflusst.

Teff-Zellen von gesunden Trägern des Risikoallels zeigen eine verminderte TCR-Signaltransduktion sowie Hyporeaktivität unter Antigenpräsentation [127, 134]. In *ptpn22*-Knockout-Mäusen wiesen T-Zellen hingegen eine verstärkte TCR-Antwort auf [131, 135]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *ptpn22*W* in T-Zellen als eine „gain-of-function“-Variante wirkt. Interessanterweise führen dabei sowohl Lyp-620W als auch der Verlust von PTPN22 zu einer Zunahme von T-Gedächtniszellen [131, 134]. Im Übrigen zeigen NOD-Mäuse mit Überexpression von *ptpn22* eine verminderte Proliferation von autoreaktiven T-Zellen und eine verminderte TCR-Signaltransduktion in naiven T-Zellen, was im Gegensatz zu Befunden in NOD-Mäusen mit *ptpn22*-Knockdown steht, in denen die Proliferation von naiven T-Zellen und ihre Aktivierung durch das TCR-Signal deutlich erhöht waren [135, 136]. Jedoch wurde für beide Mausmodelle ein klinischer Schutz vor Diabetes nachgewiesen. Dies könnte mit einem veränderten Einfluss von Über- und Unterexpression von PTPN22 auf das Treg-Zellkompartiment und einer Aktivierung von autoreaktiven Teff-Zellen zurückzuführen sein und wird nachfolgend differenzierter erläutert. In Versuchen mit Jurkat-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Funktion von PTPN22 abhängig vom Expressionsverhältnis zu Csk ist. So führte eine gemeinsame Überexpression von PTPN22 und Csk zur reduzierten Interaktion der beiden Enzyme und verstärkter TCR-Zellantwort [137]. Lyp-620W-Transfektion alleine führte hingegen zu einer verminderten TCR-Signaltransduktion [121].

Zusammenfassend stellt Lyp-W620 daher in Bezug auf die Regulierung des TCR-Signals eine „gain-of-function“-Variante dar, weist aber mit murinen Knockdown-

Modellen einen z.T. ähnlichen Phänotyp auf, wie der Anstieg von T-Gedächtniszellen. Da PTPN22-Überexpression ebenfalls zu verminderter Insulinitis sowie Schutz vor T1D führt und Versuche an Jurkat-Zellen gezeigt haben, dass die PTPN22-Funktion abhängig von der relativen Expression zu Csk ist, hat das Risikoallel von *ptpn22* eine weitaus komplexere Wirkung auf das Immunsystem als vormals angenommen. Hinzu kommt, dass die PTPN22-Exprimierung abhängig von der Zellaktivierung ist und die Phosphatase eine lange Halbwertszeit aufweist [138]. Interessanterweise liegt ein hohes Vorkommen des Enzyms in Teff- und Gedächtniszellen vor, was den vorrangigen Effekt auf diesen Zelltyp erklären könnte.

Auf Treg-Zellen wirkt sich die Risikovariante von *ptpn22* in gesunden Trägern zum Teil unterschiedlich aus. So wurde berichtet, dass die Funktion und Zellzahl von Treg-Zellen gesunder Träger nicht verändert ist, in weiteren Studien jedoch die suppressiven Eigenschaften von Treg-Zellen durch Lyp-620W negativ beeinflusst wurden [121, 128]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Studien an menschlichen Trägern von Lyp-620W zum Teil schwer durchführbar sind aufgrund von kleinen Stichproben und dem Einfluss genetischer Faktoren und Umweltfaktoren, deren Identifizierung meist nicht gelingt [127]. In Mausmodellen zeigte sich, dass die Höhe der PTPN22-Expression die Treg-Funktion entscheidend beeinflusst. So hatte eine PTPN22-Überexpression einen sehr geringen Einfluss auf die Treg-Zellzahl sowie Funktion [132, 133, 136], wohingegen ein Verlust von PTPN22 zur Vergrößerung des Treg-Zellkompartiments führte [135, 139, 140].

Neben dem TCR wirkt sich Lyp-620W auch auf die B-Zellrezeptor(BCR)-Signalkaskade aus. So weisen gesunde Träger eine verminderte BCR-Signaltransduktion sowie vermehrt Autoantikörper und autoreaktive B-Zellen in Verbindung mit erhöhter CD40-, TRAF1- und IRF5-Expression auf, die für die Proliferation von B-Zellen von Bedeutung sind. Des Weiteren konnte eine verminderte Apoptose, v.a. von B-Gedächtniszellen festgestellt werden [141-143], wobei das B-Gedächtniszellkompartiment gesamt jedoch verkleinert war [134, 144].

In R619W-Knockin-Mäusen zeigten sich ebenfalls eine verstärkte Expression von CD40 sowie eine erhöhte Antikörperbildung nach Aktivierung. Zudem war die

Apoptoserate vermindert [132, 133]. Im Gegensatz hierzu konnten Zheng und Kissler in NOD-Mäusen mit *ptpn22*-Knockdown eine erhöhte Apoptoserate von B-Zellen sowie eine verstärkte BCR-Signaltransduktion nachweisen [135].

Somit stellt das Risikoallel von *ptpn22* in B-Zellen eine „gain-of-function“-Variante dar und führt möglicherweise über eine verminderte Apoptose autoreaktiver B-Zellen zu einer gestörten Immuntoleranz.

Neben Lymphozyten beeinflusst PTPN22 auch das angeborene Immunsystem. So vermittelt IFN- γ eine vermehrte Expression von PTPN22 in Monozyten von Morbus Crohn-Patienten und der Knockdown von *ptpn22* führt zur Sekretion Th17-ähnlicher inflammatorischer Mediatoren [145]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass PTPN22 als ein wichtiger negativer Regulator der TLR-vermittelten Typ-1-IFN-Produktion in Makrophagen fungiert und Einfluss auf die Polarisierung von Makrophagen besitzt [146, 147]. Dabei stellt Lyp-620W in Zellen des angeborenen Immunsystems einen hypomorphen Typus von PTPN22 dar mit vermehrter Typ-1-IFN-Produktion.

Das PTPN22 von Bedeutung für T1D ist, zeigt die Assoziation dieser Erkrankung zu Lyp-620W in GWAS. Versuche an humanen Zellen sowie Mausmodellen weisen dabei auf eine komplexe und ausgedehnte Wirkung von PTPN22 auf die Aktivität und Steuerung des Immunsystems hin, die z.T. vom Zelltyp aber auch von der absoluten sowie relativen Expression zu anderen Enzymen sowie deren Bindungsverhältnissen untereinander abhängig ist. Jedoch ist Lyp-620W an sich wohl nicht für klinische manifeste Autoimmunität verantwortlich [132]. Autoimmunität kann zwar in PEP-R619W-Knockin Mäusen alleine durch PTPN22-Überexpression erreicht werden, jedoch nur, wenn diese auf die B-Zelllinie begrenzt ist [133]. Zudem weisen Mäuse mit *ptpn22*-Verlust erst in Verbindung mit der CD45-E613R-Mutation einen SLE-ähnlichen Phänotyp auf [137].

Somit ist der beschriebene SNP von *ptpn22* alleine - wie gesunde Träger von Lyp-620W zeigen - wohl kein Auslöser von T1D, kann aber bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren zu einem früheren Beginn der Erkrankung und einem aggressiveren Verlauf führen [148].

PTPN22 ist jedoch nicht nur mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Lyp-620W einen klinischen Schutz vor Tuberkulose bietet, wohingegen die Normvariante mit einem erhöhten Risiko für fulminante Tuberkuloseerkrankungen verbunden ist [149-151]. Dies steht in Korrelation mit einer Häufung von Lyp-R620W in Finnland und der Ukraine, wo die Frequenz des Allels ca. 15% in der Allgemeinbevölkerung beträgt, und einem nach Westeuropa hin abnehmenden Vorkommen [152]. Dies ist auch im Rahmen von T1D von Interesse, da Infekte mit Mykobakterium Avium ssp. paratuberculosis (MAP) in Verbindung mit T1D stehen [26] und das MAP Hitzeschockprotein 65kDa eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit GAD65 aufweist [153].

1.3 Ziel der Arbeit

Zheng und Kissler konnten zeigen, dass eine *ptpn22*-Stilllegung in weiblichen NOD-Mäusen zu einer signifikant verlangsamten Krankheitsentstehung von T1D führt [135]. Dabei ist unklar, über welche Mechanismen dieser klinische Schutz ausgelöst wird. Vang et al. konnten in gesunden Trägern der Lyp-620W-Variante eine stärkere Aktivierung der CD28-Signalkaskade mit einer zu Th1-Zellen verschobenen Immunantwort und einer verminderten Th17-Zellantwort nachweisen. Diese Befunde waren mit einer verminderten Suppressivität von Treg-Zellen auf die Th1-vermittelte IFN-Produktion verbunden [157]. Da sich Lyp-620W in vielen Belangen als “gain-of-function”-Variante von PTPN22 präsentiert, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage, ob der klinische Schutz von *ptpn22*-Knockdown(KD)-Mäusen auf eine veränderten Differenzierung von T-Zellen bzw. eine eingeschränkte Treg-Funktion zurückzuführen ist. Hierfür werden folgende Punkte überprüft:

- 1.) Die *in-vitro*-Differenzierungseigenschaften von Splenozyten und naiven T-Zellen in Th1- und Th17-Zellen sowie mögliche extrinsische Einflüsse auf diesen Prozess durch APCs und die Kostimulation über CD28.
- 2.) Die suppressiven Eigenschaften von *ptpn22*-KD-Treg-Zellen *in vitro* auf die Proliferation und IFN- γ -Produktion von Th1-Zellen und T-responder-Zellen.
- 3.) Die Einflüsse von *ptpn22*-KD auf die Zellverteilung in Pankreas, pLNs, und der Milz im Insulitis-Stadium. Hierbei umfassen die untersuchten Zellen CD8⁺- und

CD4⁺-T-Zellen und deren IFN- γ - und Il-17-Produktion, sowie die CXCR3-Expression; des Weiteren die Verteilung von Treg- und B-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Anwendung
Murine Il-2	Peprotech	Th1-Differenzierung/ Unstimulierte Zellen
Murine Il-12	Peprotech	Th1-Differenzierung
Recombinant mouse Il-18/Il-1F4	R&D Systems	Th1-Differenzierung
Anti m IFNGamma	BioXCell	Th17-Differenzierung
Human TGF- β 1	Peprotech	Th17-Differenzierung
Murine Il-6	Peprotech	Th17-Differenzierung
Recombinant mouse Il-23	R&D Systems	Th17-Differenzierung
PMA (in DMSO)	Sigma-Aldrich;	Restimulierung
Ionomycin (in EtOH)	Sigma-Aldrich,	Restimulierung
Golgi-Plug (in DMSO)	BD Cytofix/Cytoperm-Kit	Restimulierung
OneComp eBeads	eBiosciences	Kompensationsfärbung
Trypan Blau Lösung (0,4% (w/v) in PBS)	Mediatech, Inc	Zellzahlbestimmung
H ₃ PO ₄ 1M	MACRONChemicals	ELISA Stop Solution
Thymidin (Methyl- ³ H, 5mCi)	Perkin Elmer	Suppression Assay
Betaplate Scint for Betaplate (<i>LSC-Cocktail</i>)	Perkin Elmer	Suppression Assay

Doxycyclin	Fisher Scientific	Knockdown-Initiierung
Collagenase P	Fisher Scientific	Pankreasverdauung
HBSS	Life Technologies	Pankreasverdauung
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich	Pankreasverdauung
2-Mercaptoethanol	Invitrogen	FCS-Medium
Fetal Bovine Serum	ThermoScientific	FCS-Medium
L-Glutamin	Gibco	FCS-Medium
Penicillin/Streptomycin	Gibco	FCS-Medium
RMPI-1640 Medium	Invitrogen	FCS-Medium
KHCO ₃	Fisher Scientific	ACK-Buffer
Na ₂ EDTA	BIO Basic	ACK-Buffer
NH ₄ Cl	Fisher Scientific	ACK-Buffer
0,005% Trypsin-EDTA	Invitrogen	FACS-Buffer
DPBS	Fisher Scientific	FACS-Buffer
HyClone DPBS/MODIFIED	Fisher Scientific	FACS-Buffer
DMEM	Invitrogen	Medium für Zellkultur
0,05% Tween*20	Fisher Scientific	ELISA Wash Buffer
PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	über Joslin Diabetes Center bezogen	ELISA Wash Buffer

2.1.2 Mauslinie

NOD-Mice (Jackson-Laboratory, Bar Harbor, MA, USA)

2.1.3 Medien & Buffer

Name	Inhalt	Anwendung
10%-FCS-Medium	0,5 l RPMI-1640 Medium 50 ml 10% FCS 5 ml L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin 500 µl 2-Mercaptoethanol	Zellkultur
ACK-Buffer	8,29g NH ₄ Cl 1 g KHCO ₃ 37,2 mg Na ₂ EDTA 800 ml dest. H ₂ O Auf pH von 7,2-7,4 einstellen. Mit dest. H ₂ O auf 1 l auffüllen.	Lyse von Erythrozyten
ELISA Wash-Buffer	1l PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺) über Joslin Diabetes Center bezogen. 0,5 ml 0,05% Tween*20	Immunoassay
FACS-Buffer:	99% DPBS, 1% FCS Lagerung bei 4°C	Analyse und Färbung Fluoreszenzzytometrie
H ₃ PO ₄ 1M	372,8 ml H ₂ O 27,2 ml (85% H ₃ PO ₄)	ELISA Stop Solution
MACS-Buffer	Hyclone PBS, 0,5% FCS, 2mM EDTA. Lagerung bei 4°C.	Magnetische Zellseparation

Vor Benutzung entgasen.

Tryptophan	0,4% (w/v) in PBS	Zellzahl Bestimmung
Wash-Buffer	RPMI-1640 Medium (+L-Glutamine)	Färbung Flusszytometrie

2.1.4 Kits

Name	Hersteller	Anwendung
BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiPlug)	BD Biosciences	Intrazelluläre Färbung
CD4 ⁺ CD25 ⁺ -T-cell-isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
CD4 ⁺ CD62L ⁺ Isolation-Kit II, mouse	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBiosciences	Intrazelluläre Färbung
Mouse IFN-gamma ELISA Ready-SET-Go! [®]	eBiosciences	Immunoassay
Mouse Il-17A (homodimer) ELISA Ready-SET-Go! [®]	eBiosciences	Immunoassay

2.1.5 Geräte/Materialien

Name	Hersteller	Anwendung
Lampe (FHS/LS-1B)	(460-495 nm) BLS Ltd.	Genotypisierung
Brille (FHS/F-00)	(Binocular magnifier), BLS Ltd.	Genotypisierung
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810R 15 Amp Version	Genotypisierung
Improved Neubauer Chamber	Cat. 3200, Hausser Scientific Co	Zellzahlbestimmung
ThermoForma [®] Series II Water Jacketed CO ₂		Inkubator

Incubator (HEPA Filter)

Denville Scientific, Vortexer 59A,	Fisher Scientific, Modell 232 (Touch mixer)	Vortexmischer
MACS LD Columns	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
MACS LS Columns	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
MACS Multistand	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
MiniMACS MS Columns	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	Magn. Zellseparation
Comet XRG Controller	Faxitron X-ray Corporation	APC-Bestrahlung
Standard Harvester	Inotech intl	Suppr. Assay
Printed Filtermat A GF/C	Perkin Elmer	Suppr. Assay
Sample Bag (for MicroBeta® Trilux)	Perkin Elmer	Suppr. Assay
Casette, for 96-format filtermats	Perkin Elmer	Suppr. Assay
Dispensette III, 5ml	Perkin Elmer	Suppr. Assay
Microplate Scintillation and Luminescence Counter: 1450 Microbeta™ Trilux	Perkin Elmer	Suppr. Assay
Einmalspritzen Tuberkulin 1ml	Norm-Ject	
Sterile Cell Strainer 70 µm	Fisher Scientific	
Petri-Schale: sterile 100 mm x 15 mm	Fisher Scientific	
Pipetten Tips: 5/10/25 ml	BD Biosciences	
Pipetten Tips	USAScientific	
Pipette	Pipetman, Gilson	
Tubes: 15/50 ml	BD Biosciences	
Well plates: BD Falcon 24/48/96 well plates, flat bottom	BD Biosciences	
BD FACS tubes	Fisher Scientific	
BD FACS tubes no cap	Fisher Scientific	
ELISA: Plates	Cornin	
1,5 ml Natural Microcentrifuge Tubes	USA Scientific	
Einmalspritzen 10ml, Luer	Norm-Ject	Pankreasverdauung

Lock

ELISA: Synergy 2 Multi-Mode Reader	BioTek	Pankreasverdauung
FACS: LSR II	BD Biosciences	Pankreasverdauung
Infusion 30g blunt needle 0,5in 100 Bulk	SAI	Pankreasverdauung
Thermomixer® R	Eppendorf International	Pankreasverdauung

2.1.6 Software

FACSDiva 2.2

FLOWJO (9.6.1), LCC

Prism (5.0d) Macintosh Version, GraphpadSoftware, Inc.

Biotek Synergy MX Gen5(1.08) Auslese-Software:, Protocol 450 nm, → ELISA

Microsoft Excel (14.2.5 for Macintosh)

2.1.7 Antikörper

Antigen	FC	Klon	Hersteller	Konzentration/ Verdünnung
CD28		37.51	Biolegend	1 µg/ml
CD3 ε		145-2C11	Biolegend	1 µg/ml
CD4	APC	GK1.5	Biolegend	1:1000
CD4	BV605	RM4-5	Biolegend	1:800
CD4	PB	GK1.5	Biolegend	1:800
CD4	PE	GK1.5	Biolegend	1:1000
CD4	PE/Cy7	RM4-5	Biolegend	1:2000
CD45R/B220	BV605	RA3-6B2	Biolegend	1:800
CD8a	PB	53-6.7	Biolegend	1:800
CD8a	APC	53-6.7	Biolegend	1:800
CXCR3	BV421	CXCR3-173	Biolegend	1:100
Fc-Block		Clone 93	Biolegend	1mg/ml

FoxP3	PE	FJK-16s	eBiosciences	1:300
IFN- γ	APC	XMG 1.2	Biolegend	1:100
Il-17A	PE	TC11-18H10.1	Biolegend	1:300
Ki-67	PerCP eFluor	710 SolA15	eBiosciences	1:300
Rat IgG ₁ κ	APC	RTK2071	Biolegend	1:100
Rat IgG ₁ κ	PE	RTK2071	Biolegend	1:300

2.2 Methodik

2.2.1 Mauslinien und *ptpn22*-Knockdown

Transgenetische Mäuse wurden von Zheng und Kissler durch Mikroinjektion von NOD-Zygoten mit Lentiviren erstellt. Diese enthielten eine short-hairpin-RNA-(shRNA)-Expressionskassette (P2 oder P4), die sich gegen *ptpn22*-mRNA richtete [135, 158] (siehe Abb. 5). Entsprechend der verwendeten shRNA werden die transgenetischen Mäuse im Folgenden P2- und P4-Mäuse genannt. Die Induktion des Knockdowns wurde über Zugabe von Doxycyclin zum Trinkwasser gesteuert. Mäuse wurden unter pathogenfreien Verhältnissen nach Leitlinien des Labors am Joslin Diabetes Center in Boston, MA, USA, gehalten.

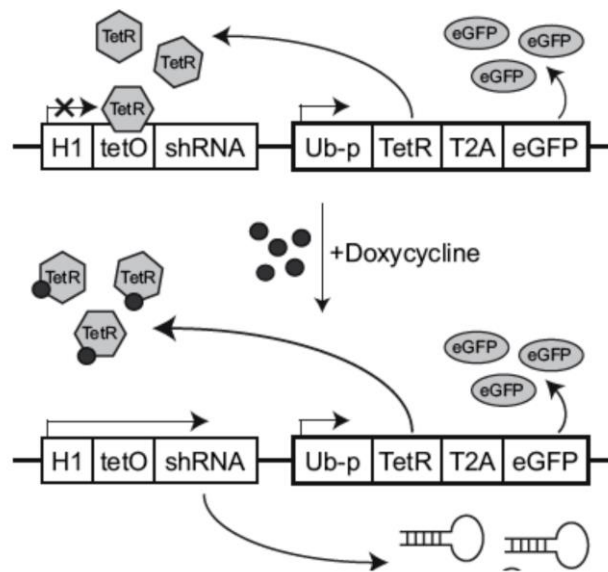


Abbildung 5: Funktionsweise der shRNA-Expressionskassette. Die Expressionskassette exprimiert ubiquitär „tetracycline resistance operon repressor“ (TetR), der sich anschließend an den „tetracycline operator“ (tetO) bindet und so eine Expression der shRNA unterbindet. Zur Genotypisierung wird ebenfalls ubiquitär eGFP gebildet. Unter Doxycyclingabe wird das exprimierte TetR gebunden und kann nicht mehr an die tetO-Region binden und prohibierend auf die Expression der shRNA einwirken. Die freie shRNA kann nun an *ptpn22*-mRNA binden und führt zur Genstilllegung (Silencing) von *ptpn22*. (Nach Herold et al. 2008. Inducible and reversible gene silencing by stable integration of an shRNA-encoding lentivirus in transgenic rats. Proc Natl Acad Sci U S A Vol. 105 Nr. 47)

2.2.2 Genotypisierung

Der Ubiquitin Promoter der shRNA-Expressionskassette exprimiert konstitutiv eGFP. Mäuse wurden im Alter von einer Woche mittels blauen Lichts (460-495 nm) auf Fluoreszenz untersucht. Transfizierte Mäuse wurden anschließend mit Ohrclip markiert.

2.2.3 Knockdown-Initiierung

Dem Trinkwasser der Mäuse wurde – wenn nicht anders vermerkt – über zwei Wochen 50 µg/mL Doxycyclin hinzugefügt bevor die Versuche durchgeführt wurden.

Mäuse, die Doxycyclin erhielten, werden im Folgenden mittels „+“ hinter ihrer Bezeichnung deklariert und Kontrollgruppen ohne Doxycyclin mittels „-“.

2.2.4 Zelldifferenzierung

Zellgewinnung:

Mäuse wurden mittels CO₂ geopfert und anschließend Milz und Lymphknoten (inguinal, mediastinal, axillär und zervikal) entnommen. Mit Hilfe von Spritzenkolben wurden Milz und Lymphknoten durch ein Filtersieb (70 µm Maschen) gedrückt, strukturell aufgelöst und in 10%-Medium auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die gewonnenen Zellen aus der Milz zentrifugiert (1400 U-min, 4 min, 4°C) und Erythrozyten mittels Zugabe von ACK-Buffer für eine Minute lysiert. Die Splenozyten wurden gewaschen (mit 10%-Medium aufgefüllt und zentrifugiert) und in 10%-Medium resuspendiert. Die Zellen aus den Lymphknoten wurden zentrifugiert und zusammen mit Splenozyten in ein konisches Röhrchen überführt. Zur Vereinfachung wird die Mischung beider Zelltypen als Splenozyten bezeichnet.

Zellisolation:

Die Zellzahl der Splenozytenlösungen wurde per verbesserter Neubauer-Zählkammer und Trypanblau bestimmt. Splenozyten wurden nach der Zellzahlbestimmung direkt in Suspension gegeben. Naive T-Zellen wurden mittels magnetischer Zellseparation (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben aus Splenozyten isoliert und in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml suspendiert (Die Zellreinheit lag nach Isolierung bei 93,4-95,5%, Daten nicht gezeigt). APCs wurden durch erste positive Isolierung der naiven T-Zell-Isolierung während der magnetischen Zellseparation (Miltenyi Biotec) gewonnen und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert.

Alle Zellsuspensionen wurden mit 10%-Medium erstellt und während der Verarbeitung auf Eis gelagert. Um verbleibendes Fett und andere Bestandteile der Milz und LN zu entfernen, wurden Suspensionen vor Erstellung der Ausgangslösungen erneut durch einen Cell Strainer geseiht.

Polarisierung:

Splenozyten und naive T-Zellen (+/- APCs) wurden in 10%-Medium auf 48 Wellplates mit folgenden Zellzahlen angesetzt:

- Splenozyten: $1,5 \times 10^6$ Zellen/Well
- APCs: $1,0 \times 10^6$ Zellen/Well
- Naive T-Zellen: $1,0 \times 10^6$ Zellen/Well bzw. 2×10^5 Zellen/Well (+ APCs)

Anschließend wurden die Zellen unter folgenden Polarisierungsbedingungen über 5 Tage (37°C, 5% CO₂) inkubiert:

- Th1: Il-2 (20 U/ml), Il-12 (25 ng/ml), Il-18 (25 ng/ml),
aCD3 (1 µg/ml, 2 µg/ml*), aCD28 (1 µg/ml)*
 - Th17: Il-6 (30 ng/ml), Il-23 (15 ng/ml), TGF-β (2ng/ml), aIFN-γ (1 µg/ml),
aCD3 (5µg/ml), aCD28 (1 µg/ml)*
 - Th0: aCD3 (2 µg/ml), aCD28 (1µg/ml)*
 - Unstimuliert: Il-2 (5 µg/ml)
- Doxycyclin: n.B. 1 µl/ml

*: Bei Polarisierungen von naiven T-Zellen ohne APCs

Zellsplitting:

Zellen wurden während der Polarisierung bei Bedarf in zwei Wells aufgeteilt, wenn das Medium farblich umschlug oder Zellen konfluieren. Wells wurden mit entsprechenden Differenzierungslösungen und bei Bedarf Doxycyclin wieder aufgefüllt.

Restimulation:

Am fünften Tag wurden Zellen mittels PMA (5 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) für 4-5 Stunden restimuliert. Zur Akkumulation von Zytokinen im Zellplasma wurde zusätzlich Golgi-Plug (1 mg/ml, BD Cytofix/Cytoperm-Kit) zugegeben. Unstimulierten Zellen wurde nur Golgi-Plug zugegeben.

2.2.5 Analyse

2.2.5.1 Flusszytometrie

Für Verdünnungen und Resuspensionen wurde 1% FACS-Buffer verwendet. Nach der Restimulation wurden Zellen resuspendiert und in FACS-Röhrchen/96 Wellplates überführt (dabei wurde ein Teil des Überstandes zuvor für Immunoassay-Analysen (Siehe Immunoassays)) abgenommen und eingefroren (-20°C).

Für Isotypenkontrollen wurden pro Zelltyp (Splenozyten, naive T-Zellen, APCs und naive T-Zellen) und Polarisierung (Th1, Th17, Th0 und unstimuliert) Zellen gesichert.

Dabei wurden Zelltypen von verschiedenen Mäusen (WT, P2, P4) gemischt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die zu untersuchenden Zellen zentrifugiert und mit Fc-Block (1ng/ml, 1:100 Verdünnung in FACS-Buffer) für 10 Minuten (4°C) behandelt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit FACS-Buffer gewaschen und zentrifugiert. Die Oberflächenfärbung von CD4 wurde in 50 µl FACS-Buffer/Probe für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt. Diese sowie jede folgende Färbung geschah dabei abgedunkelt um eine Photobleichung zu verhindern. Verwendeter Farbstoff mit Verdünnungen:

CD4 BV605 (1/800)

CD4 PB (1/800)

Anschließend wurden Proben mit FACS-Buffer aufgefüllt, zentrifugiert und in FACS-Buffer resuspendiert.

Für intrazelluläre Färbungen wurde das Cytofix/Cytoperm-Kit (BD) angewandt. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden diese über 20 Minuten mit 250 µl BD Cytofix/Cytoperm-Lösung bei 4°C permeabilisiert und anschließend zweimal mit BD Perm/Wash-Buffer (1x) gewaschen. Die Zellen wurden auf intrazelluläre Zytokine (IFN- γ , IL-17) in 50 µl Perm/Wash-Buffer über 30 Minuten (4°C) mit aufgeführten Antikörpern gefärbt. Verwendeter Farbstoff mit Verdünnungen:

IL-17A PE (1/300)

IFN- γ APC (1/100)

Isotypenkontrollen wurden wie Proben behandelt, jedoch intrazellulär auf IgG₁-Antikörper (Ratte) gefärbt. Verwendete Farbstoffe:

Oberflächenfärbung mit Verdünnungen:

CD4 PB (1/800) → Th17, Th0

CD4 BV605 (1/800) → Th1

Intrazelluläre Färbung mit Verdünnungen:

IgG1 PE Rat (1/300)

IgG1 APC Rat (1/100)

Abschließend wurden die Proben erneut zweimal mit BD Perm/Wash-Buffer aufgereinigt und anschließend in 200 µl resuspendiert und über Nacht bei 4°C gelagert.

Kompensationsfärbungen wurden am Morgen direkt vor der Analyse angesetzt. Hierfür wurden CompBeads (BD) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Beads wurden gevortext und ein Tropfen (ca. 60 µl) in einem FACS-Röhrchen mit 100 µl FACS-Buffer für 30 Minuten mit 20 µl Antikörper inkubiert (20°C, lichtgeschützt).

Verwendete Farbstoffe mit Verdünnungen:

CD4-PB (1/800)

CD4-PE (1/1000)

CD4-APC (1/1000)

Anschließend wurden 2 ml FACS-Buffer zugegeben, zentrifugiert und die Beads in 0,5 ml FACS-Buffer resuspendiert. Zur Analyse wurde ein LSR-II-Gerät genutzt. Für 96 Wellplates wurde zusätzlich ein High Throughput Sampler System angeschlossen.

2.2.5.2 Immunoassay

Immunoassays wurden mit eBioscience Mouse ELISA Ready-SET-Go![®]-Kits nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Aufgrund der hohen Sensitivität des Kits mussten Überstände stark verdünnt werden. ELISA Platten (Rundboden, Corning Costar) wurden je Well mit 100 µl Capture-Antikörper in Coating-Buffer über Nacht bei 4°C inkubiert, anschließend mit Waschpuffer gespült und mit 200 µl Assay Diluent für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. In den obersten zwei Reihen wurden Standardreihen mit Zweifachverdünnung angesetzt mit insgesamt acht Verdünnungsintervallen. Die restlichen Wells wurden mit den zu untersuchenden Proben befüllt und die Platte zwei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Darauf wurde nach fünfmaligem Waschen der Detektionsantikörper (100 µl/Well) aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Avidin-HRP (100 µl/Well) aufgetragen und die Proben für weitere 30 Minuten bei Zimmertemperatur bebrütet. Im Anschluss wurden die Proben weitere fünf Mal gewaschen und die Substratlösung (100 µl/Well) für 15 Minuten aufgetragen. Die Reaktion wurde mittels Stopplösung (50 µl/Well) beendet. Anschließend wurde die Platte bei 450 nm ausgelesen. Interpolation der Mittelwerte wurde für Triplates mit Prism Graphpad durchgeführt.

2.2.5.3 Suppression Assay

Splenozyten wurden wie beschrieben aus Milz und LNs von mit Doxycyclin behandelten WT- und P2-Mäusen (9 Wochen alt) gewonnen und anschließend naive T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben isoliert. P2 und WT naive T-Zellen wurden als Triples (24 Wellplate, jeweils 1x10⁶ Zellen/Well) über 5 Tage unter Th1-Bedingungen mit (1mg/ml) Doxycyclin wie beschrieben polarisiert und mussten während der Zeit zweimal gesplittet werden. Anschließend wurden die Zellen für zwei Tage mittels Zugabe von Il-2-Lösung (10 U/ml, 1,8 ml) restimuliert. Am siebten Tag wurden regulatorische T-Zellen aus Maus-Splenozyten (WT- und P2- Mäuse, 7-10 Wochen alt) mit Hilfe von CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben isoliert.

APCs wurden aus der ersten positiven Isolation der Zellseparation gewonnen und anschließend bestrahlt (47 Gy). Die im zweiten positiven Isolierungsschritt gewonnenen Tresp-Zellen (CD4⁺CD25⁻-Zellen) wurden ebenfalls aufbewahrt. Die Th1-Zellen wurden resuspendiert und die Zellzahl von Th1, APCs, regulatorischen T-Zellen und Tresp-Zellen mittels Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit folgender Konzentration in Medium resuspendiert:

Tresp/Th1/Treg: 4x10⁵ Zellen/ml

APCs: 4x10⁶ Zellen/ml

Um eine Aussage über die unterschiedlichen suppressiven Eigenschaften der Treg-Zellen treffen zu können, wurden für die angefertigten Suppression Assays Treg-Zellen von WT- und P2-NOD-Mäusen mit Th1- bzw. Tresp-Zellen von P2- und WT-Mäusen gemischt und anschließend inkubiert. Insgesamt wurden somit acht Suppression Assays erstellt. Die Assays wurden auf 96er-Wellplatten durchgeführt, wobei pro Treg/Teff-Mix 3(Triples)x 12 Wells wie folgt befüllt wurden:

Reihen 1-12 wurden mit 50 µl 10% Medium befüllt, Reihen 2-12 ebenfalls mit aCD3 (1 µg/ml) sowie 1 mg/ml Doxycyclin/Well zur Stimulation der Teff-Zellen. Regulatorische T-Zellen wurden zu Wells in Reihe 3 und 4 hinzugegeben.

Für die Wells 4-12 wurde eine Verdünnungsreihe der Tregs um den Faktor zwei durchgeführt. Des Weiteren wurde jedem Well 2x10⁵ bestrahlte APCs zugegeben. Mit

Ausnahme von Reihe 3 wurde in die Wells 2×10^4 Tresp- oder Th1-Zellen appliziert. Anschließend wurden die Zellen inkubiert (37°C , 5% CO_2).

Nach drei Tagen wurden die Kulturen mittels H-markiertem Thymidin gepulst ($0,005 \mu\text{Ci}/\text{Well}$, Perkin Elmer, Methyl- H^3) und für weitere 16 Stunden inkubiert. Vorher wurden $100 \mu\text{l}$ Überstand für ELISA-Untersuchungen (IFN- γ) abgenommen und eingefroren (-20°C) und Wells mit $100 \mu\text{l}$ 10%-Medium aufgefüllt. Nach der Pulsmarkierung durch Thymidin wurden die Zellen mittels Harvester auf Papier übertragen und mit Betaplate Scint eingeschweißt und anschließend im Microplate Scintillation and Luminescence Counter (Perkin Elmer) ausgelesen (60s).

Um die Ergebnisse der durchgeführten Suppression Assays miteinander vergleichen zu können, wurden die Proliferation (cpm) der einzelnen Verdünnungen zum Mittelwert der Teff-Triplikate ohne Treg-Zugabe desselben Suppression Assays ins Verhältnis gesetzt (% cpm). Hierdurch konnte die relative Suppression einer Verdünnung von mehreren Assays miteinander Verglichen werden.

2.2.6 Insulitis-Experiment

Vier Wochen alten Mäusen (Weibchen, 7xWT, 7xP2) wurde für neun Wochen Doxycyclin zum Trinkwasser beigegeben und anschließend geopfert. Pankreata und pLNs wurden entnommen sowie Milz und Lymphknoten zur Kontrolle.

2.2.6.1 Pankreasverdauung

Pro Pankreas wurden 0.002g Kollagenase P in 2 ml HBSS aufgelöst ($1\text{mg}/\text{ml}$). Mittels Spritze und Kanüle wurde die Kollagenase in den Pankreas injiziert und dieser im Thermomixer verdaut (37°C , $700 \text{ U}/\text{min}$, 8 min). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von HBSS und FCS gestoppt und der anverdaute Pankreas auf Eis gelagert. Mittels Pipette und Sieb wurde das Pankreasgewebe strukturell aufgelöst, zentrifugiert ($1400 \text{ U}/\text{min}$, 4 min , 4°C) und in HBSS resuspendiert (10ml). Die Lösung wurde mit 5ml Histopac unterschichtet und zentrifugiert ($2400 \text{ U}/\text{min}$, 15 min , 4°C , ohne Bremse). Oberer, klarer Überstand wurde verworfen und der Rest erneut

zentrifugiert (1400 U/min, 4 min, 4°C) und in FCS-Medium resuspendiert. Splenozyten und Zellen aus pankreatischen Lymphknoten wurden wie bereits beschrieben gewonnen.

2.2.6.2 Analyse

Flusszytometrie:

Die Zellen wurden wie folgt für FACS-Untersuchungen vorbereitet:

Färbung für intrazelluläre Zytokine:

Ein Teil der Zellen aus Pankreas, pankreatischen Lymphknoten und Splenozyten wurde in 10% Medium mit PMA(0,5 µg/ml)/Ionomycin (20 µg/ml)/ Golgi-Plug(1%-FACS-Buffer) für 4 Stunden restimuliert. Isotypenkontrollen wurden wie in 3.5.1 beschrieben je Organ aus WT- und P2-Mäusen gepoolt. Anschließend wurde die Färbung wie folgt durchgeführt:

Die Zellen wurden zentrifugiert und mit 1%-FACS-Buffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Fc-Block (1µl in 100 ul Buffer/Well) für 10 Minuten bei 4°C inkubiert und wieder mit FACS-Buffer gewaschen und zentrifugiert.

Oberflächenfärbungen wurden in 50 µl FACS-Buffer für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt. Verwendete Antikörper mit Verdünnungen:

PB CD8 (1/800)

PE-Cy7-A CD4 (1/2000)

Anschließend wurden die Zellen erneut mit FACS-Buffer gewaschen. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mittels Cytofix/Cytoperm (100 µl/well) für 20 Minuten bei 4°C permeabilisiert und zweimal mit Permash gewaschen. Die Färbung mittels Antikörper wurde in 50 µl Permash pro Well für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt. Folgende Antikörper und Verdünnungen wurden verwendet:

Il-17-PE (1/300)

IFN-γ-APC (1/100)

Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Permash gewaschen und in FACS-Buffer resuspendiert.

Isotypenkontrollen wurden in FACS-Buffer gewaschen und intrazellulär auf IgG₁-Antikörper (Ratte) gefärbt. Verwendete Farbstoffe:

Oberflächenfärbung mit Verdünnungen:

PB CD8 (1/800)

PE-Cy7-A CD4 (1/2000)

Intrazelluläre Färbung mit Verdünnungen:

IgG1 PE Rat (1/300)

IgG1 APC Rat (1/100)

Färbung für FoxP3-Expression:

Restzellen von Pankreas, Milz und LK wurden direkt ohne Restimulierung gefärbt.

Hierfür wurde die Oberflächenfärbung in 50 µl FACS-Buffer für 30 Minuten bei 4°C durchgeführt. Verwendet Antikörper mit Verdünnungen:

BV 421 CXCR3 (1/100)

Qdot 605 B220 (1/800)

APC CD8 (1/800)

PE-Cy7 CD4 (1/2000)

Anschließend wurden die Zellen erneut mit FACS-Buffer gewaschen. Die intrazelluläre FoxP3-Färbung wurde mittels FoxP3 Staining Kit (BD Biolegend) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden Zellen mit FOXP3 Fix/Perm-Lösung 20 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend mit FACS-Buffer gewaschen (zentrifugiert bei 250Xg für 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einmalig mit Biolegend's FOXP3-Perm-Buffer (1X) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut in FOXP3-Perm-Buffer resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl FOXP3-Perm-Buffer (1X) mit Anti-FoxP3-Antikörpern resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Verwendeter Antikörper mit Verdünnungen:

PE FoxP3 1/100

Abschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Buffer gewaschen und zur Analyse in 0,5 ml FACS-Buffer resuspendiert.

Isotypenkontrollen wurden mit FACS-Buffer gewaschen und intrazellulär auf IgG₁-Antikörper (Ratte) gefärbt. Verwendete Farbstoffe:

Intrazelluläre Färbung mit Verdünnungen:

IgG1 PE Rat (1/100)

Kompensationsfärbungen wurden am Morgen direkt vor der Analyse wie in 3.5.1 vorbereitet. Verwendete Farbstoffe mit Verdünnungen:

CD4-PB (1/800)

CD4-PE (1/1000)

CD4-APC (1/1000)

CD4-PE-Cy7 (1/2000)

CD4-BV605 (1/800)

Anschließend wurden 2 ml FACS-Buffer zugegeben, zentrifugiert und die Beads in 0,5 ml FACS-Buffer resuspendiert.

Analyse

Flusszytometrie-Analysen wurde anhand von LSR-II und FACS Aria durchgeführt.

2.2.7 Statistik

Die Statistische Auswertung erfolgte mittels der Software Prism Graphpad, Excel sowie SPSS. Dabei wurde aufgrund der kleinen Testgruppen unabhängige, zweiseitige T-Tests bzw. einfaktorielle Varianzanalyse genutzt (Die Homogenität der Daten wurde mit Levene-Test ermittelt). Als Posthoc-Test wurden je nach Vorliegen von Homogenität Games-Howell oder Tukey-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde für $p > 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist untergliedert in drei Abschnitte und umfasst den Vergleich von *ptpn22*-Knockdown- und WT-NOD-Mäusen in ihren Eigenschaften der *In-vitro*-Polarisierung von CD4⁺-T-Zellen in Th1- und Th17-Zellen, *in-vitro*-Suppression von Treg-Zellen auf Th1- und Tresp-Zellen und *in-vivo*-Zellverteilung während des Insulitisstadiums in NOD-Mäusen.

3.1 PTPN22 und die T-Zell-Differenzierung

3.1.1 Einfluss von *ptpn22*-KD auf Splenozyten

Als negativer Regulator der proximalen Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) hat PTPN22 einen direkten Bezug zur Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen.

Vor Kurzem konnte nachgewiesen werden, dass CD4⁺-T-Zellen gesunder homozygoter Träger der 620W-Variante von PTPN22 nach *in-vitro*-Stimulierung mehr IFN- γ , jedoch weniger IL-17 produzierten [157]. Aufgrund der Bedeutung von Th1- und Th17-Zellen für die Pathogenese von Typ-1-Diabetes und den Ergebnissen von Vang et al. stellt eine veränderte Differenzierung und Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen durch den P2-Knockdown eine mögliche Erklärung für den klinischen Schutz von P2-Mäusen vor T1D dar.

Zur Auswertung wurden Splenozyten von WT-, P2-, und P4-Mäusen, die unter Th1- und Th17- Konditionen differenziert wurden, auf CD4⁺-T-Zellen untersucht. Dabei wurden absolute Zellzahlen an CD4⁺-Zellen sowie der prozentuale Anteil in der Flusszytometrie bestimmt. Diese Analyse diente dazu etwaige Unterschiede in der CD4⁺-T-Zellpopulation von WT-, P2-, und P4-Mäusen aufzudecken sowie mögliche Unterschiede in der Th1- und Th17-Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen in Knockdown- und WT-Mäusen richtig evaluieren zu können.

Für Splenozyten zeigten sich in der Th1-Differenzierung und in der Th17-Differenzierung zwischen Knockdown-Gruppen und WT-Mäusen homogene

Mittelwerte für prozentuale CD4⁺-Zellanteile als auch absolute CD4⁺-Zahlen. Dabei lagen in der Th1-Differenzierung etwas höhere Anteile an CD4⁺-Zellen als unter Th17-Differenzierung vor. Für die absolute Anzahl an CD4⁺-Zellen ergaben sich vergleichbare Mittelwerte, sowohl unter Th1-Bedingungen als auch unter Th17-Differenzierung (Siehe Abb. 6 A).

Da Splenozyten einer Gruppe für Th1- und Th17-Differenzierungen aus demselben Zellpool stammten und in gleicher Zellzahl angesetzt wurden, liegt die Annahme nahe, dass in alleiniger Betrachtung der prozentualen Anteile von CD4⁺-Zellen Splenozyten unter Th1-Differenzierung stärker proliferierten, als unter Th17-Differenzierung, in Anbetracht der vergleichbaren absoluten CD4-Zellzahlen zwischen Th1- und Th17-Differenzierung ist hier jedoch von einem negativen Effekt der Versuchsbedingungen auf die nicht CD4⁺-Zellen auszugehen.

In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigte sich für Splenozyten aus WT- und P2-Mäusen weder unter Th1-Differenzierung noch Th17-Differenzierung ein Unterschied in der absoluten Zellzahl oder im prozentualen Anteil an CD4⁺-Zellen. Dieses Ergebnis bezog sich sowohl auf den Vergleich von doxycyclinbehandelten WT-Splenozyten zu P2-Splenozyten als auch auf den Vergleich von doxycyclinbehandelten Splenozyten zu ihren Kontrollen ohne Doxycyclingabe. Ausgenommen hiervon war der prozentuale CD4⁺-Zellanteil von P2-Splenozyten unter Th17-Differenzierung ($p < 0,001$, Siehe Abb. 6 A), wobei der *ptpn22*-Knockdown zu einem signifikant verminderten Mittelwert führte.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *ptpn22*-Knockdown unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen bedeutenden Einfluss auf die CD4⁺-Differenzierung hatte.

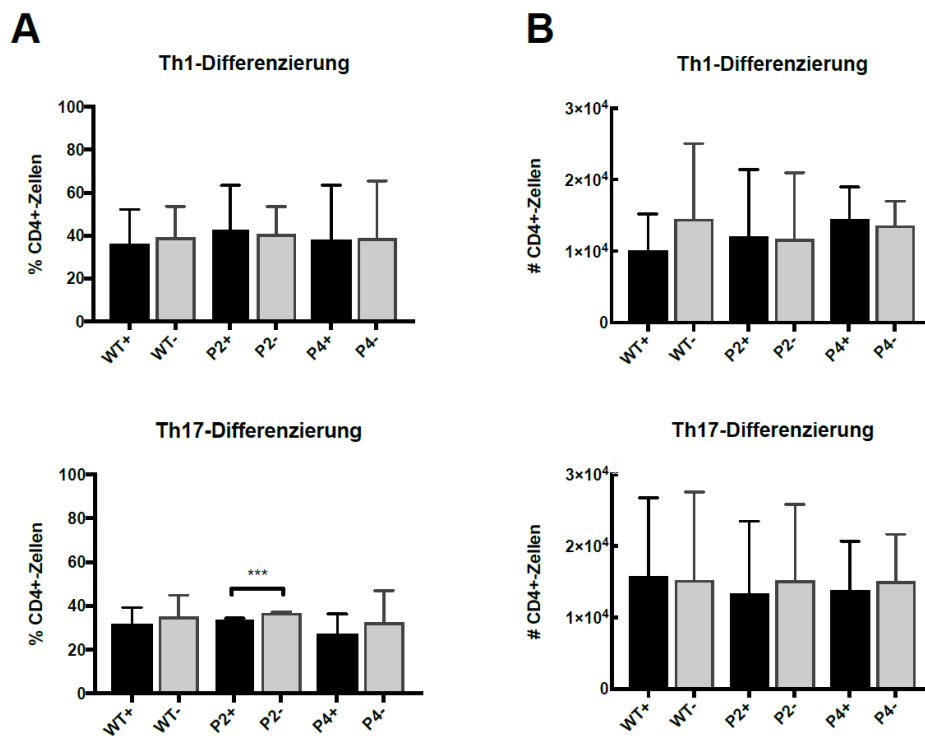


Abbildung 6: CD4⁺-Zellen von WT-, P2- und P4-Splenozyten unter Th1- und Th17-Differenzierung. Verglichen wurden die prozentuellen Anteile (A) sowie die absolute Zellzahl (B) von CD4⁺-Zellen an Splenozyten nach Inkubation unter Th1- bzw. Th17-Differenzierung. Eine Zugabe von Doxycyclin zur PTPN22-Knockdown wurde mittels „+“ gekennzeichnet. Hierbei wiesen Splenozyten von P2-Mäusen unter Doxycyclingabe eine signifikant verminderte prozentuale Anzahl an CD4⁺-Zellen unter Th17-Differenzierung auf (***=p<0,001).

Zum Nachweis von Differenzierung und Aktivierung von Th1- und Th17-Zellen wurde deren IFN- γ - und IL-17-Produktion genutzt. Gelöste Zytokine wurden dabei mittels Immunoassay analysiert, die intrazelluläre IFN- γ - und IL-17-Produktion wurde durch Flusszytometrie nach Restimulierung untersucht. Ein vorheriges Gating auf CD4⁺-Zellen stellte die Spezifität der Ergebnisse für Th-Zellen sicher. Versuche mit unstimulierten Zellen und Zellen unter Th0-Differenzierung sind der Übersichtlichkeit wegen nicht abgebildet, zeigen für die IFN- γ - sowie IL-17-Produktion jedoch signifikant niedrigere Werte als Th1- und Th17-Zellen von WT- wie auch Knockdown-Mäusen. Gleiches gilt für die IL-17-Produktion von Th1-Zellen sowie die IFN- γ -Produktion von Th-17-Zellen.

In der Flusszytometrie unter Th1-Differenzierung zeigte sich für P2⁺-Splenozyten ein zu WT⁺-Splenozyten sowie zur Kontrollgruppe vermindertes arithmetisches Mittel an IFN-

y-positiven CD4⁺-Zellen (Abb. 7 A). Dieses Ergebnis war ebenfalls im IFN- γ -Immunoassay für P2⁺-Mäuse zu beobachten (Abb. 7 B). Die Unterschiede zwischen WT- und P2-Zellen waren jedoch weder in der Flusszytometrie noch im Immunoassay signifikant. Ebenfalls lagen keine Unterschiede zwischen Kontrollgruppen und Knockdown vor (Daten nicht gezeigt).

P4⁺-Splenozyten zeigten in der Flusszytometrie ein leicht erhöhtes arithmetisches Mittel für die IFN- γ -Produktion (Abb. 7 A) im Vergleich zu WT⁺-Splenozyten ebenfalls ohne Nachweis eines signifikanten Unterschieds.

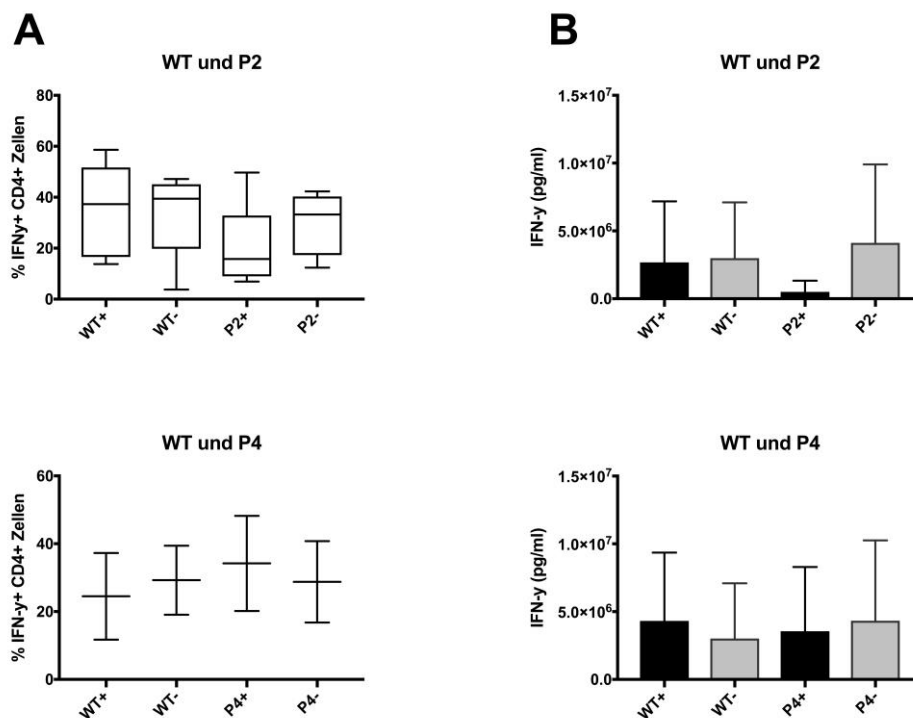


Abbildung 7: Splenozyten unter Th1-Differenzierung. Unter Th1-Differenzierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen CD4⁺-Zellen von P2- bzw. P4-Mäusen zu WT-Mäusen bezüglich der intrazellulären IFN- γ -Produktion (A) in der Flusszytometrie oder der extrazellulär gemessenen IFN- γ -Konzentration (B) mittels Immunoassay. Versuche mit P2-Mäusen beinhalten 5 Mäuse/Gruppe in der Flusszytometrie und 3 Mäuse im Immunoassay. Versuche mit P4-Mäusen beinhalten 2 Mäuse/Gruppe. Ergebnisse wurden als Mittelwert mit SD wiedergegeben.

Im Immunoassay waren die Mittelwerte der IFN- γ -Produktion unter den Gruppen vergleichbar (Siehe Abb. 7 B), wobei sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten.

Somit kann festgehalten werden, dass trotz verminderter intrazellulärer und extrazellulärer IFN- γ -Werte für P2-Splenozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Mäusen und Knockdown-Mäusen bezüglich der Differenzierungseigenschaften von Splenozyten in Th1-Zellen für die durchgeführten Experimente zu beobachten waren.

Für Splenozyten unter Th17-Differenzierung zeigten sich im Immunoassay erhöhte Werte der P2⁺-Gruppe im Vergleich zu WT⁺-Zellen (Abb. 8 A). Unterschiedliche Grundgesamtheiten bestanden bei einer großen Streuung der Werte für P2⁺-Splenozyten jedoch nicht. Die intrazelluläre Il-17-Produktion war zwischen WT- und P2-Splenozyten vergleichbar (Siehe Abb. 8 B). Dabei waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar.

Versuche an P4-Splenozyten zeigten ähnliche Anteile an Il-17⁺CD4⁺-T-Zellen zwischen WT- und Knockdown-Gruppen mit einer hohen Streuung für WT⁺-Zellen (Abb. 8 A). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich ebenfalls in der extrazellulären Il-17-Produktion, wobei WT-Zellen sowohl ein erhöhtes arithmetisches Mittel als auch eine vermehrte Streuung der Werte aufwiesen (Abb. 8 B). Eine statistische Signifikanz bezüglich P4-Splenozyten und WT-Splenozyten unter Th17-Differenzierung war dabei weder in der Flusszytometrie noch im Immunoassay nachweisbar.

Es konnten somit für Splenozyten unter Th1- und Th17-Differenzierung sowohl in der Flusszytometrie für IFN- γ ⁺- und Il-17⁺CD4⁺-Zellen als auch für die durchgeführten Immunoassays für IFN- γ und Il-17 keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-NOD-Mäusen und P2- bzw. P4-NOD-Mäusen festgestellt werden.

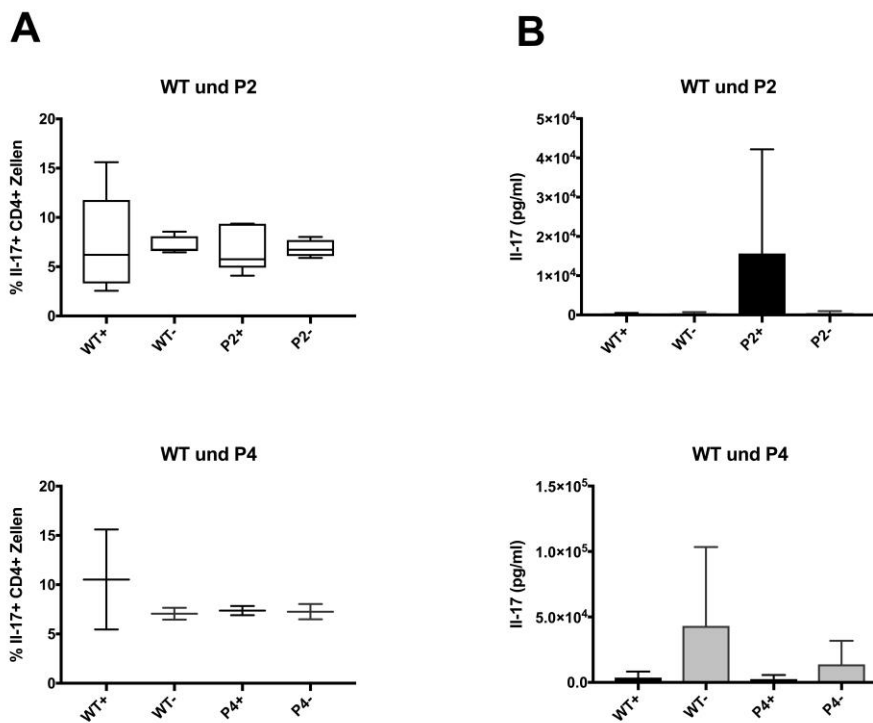


Abbildung 8: Splenozyten unter Th17-Differenzierung. Unter Th17-Differenzierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen CD4⁺-Zellen von P2- bzw. P4-Mäusen zu WT-Mäusen bezüglich der intrazellulären Il-17-Produktion (A) in der Flusszytometrie oder der extrazellulär gemessenen Il-17-Konzentration (B) mittels Immunoassay. Versuche mit P2-Mäusen beinhalteten 5 Mäuse/Gruppe in der Flusszytometrie und 3 Mäuse im Immunoassay. Versuche mit P4-Mäusen beinhalteten 2 Mäuse/Gruppe. Ergebnisse wurden als Mittelwert mit SD angegeben.

3.1.2 Einfluss von *ptpn22*-KD auf naive T-Zellen

Da sich in den Versuchen mit P2-Splenozyten zwar eine Tendenz zu niedrigerer IFN- γ -Produktion und Differenzierung in Th1-Zellen zeigte, diese jedoch nicht statistisch signifikant war, wurden weiterführende Versuche an aus Splenozyten isolierten naiven CD4⁺-T-Zellen durchgeführt, um mögliche Einflüsse von anderen Zellpopulationen aus den Splenozytenversuchen auf die Ergebnisse auszuschließen.

Wie für Splenozyten wies die absolute Anzahl an CD4-Zellen auch für Versuche mit naiven CD4⁺-Zellen eine relativ homogene Mittelwertverteilung der Gruppen auf (Abb. 9 B). Zudem war der prozentuale Anteil an CD4⁺-Zellen mit Werten für IFN- γ -Differenzierung und für Il-17-Differenzierung vergleichbar (Abb. 9 A).

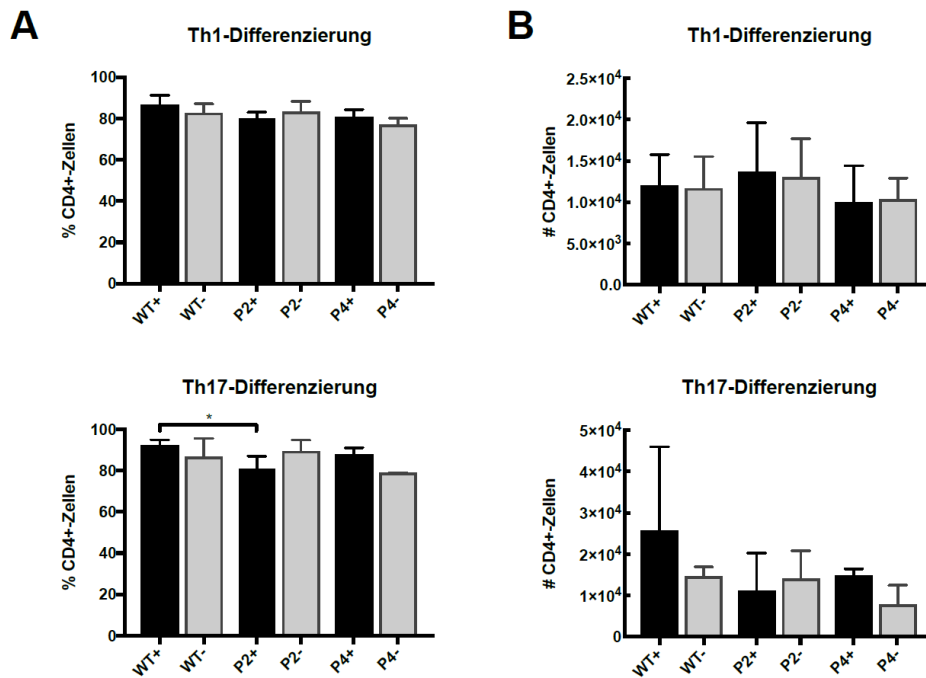


Abbildung 9: Naive CD4⁺-Zellen von WT-, P2- und P4-Splenozyten unter Th1- und Th17-Differenzierungen. Verglichen wurden die prozentuellen Anteile (A) sowie die absolute Zellzahl (B) an naiven CD4⁺-Zellen nach Inkubation unter Th1- bzw. Th17-Differenzierung. Eine Zugabe von Doxycyclin zur PTPN22-Knockdown wurde mittels „+“ gekennzeichnet. Hierbei wiesen P2-Mäusen unter Doxycyclingabe eine signifikant verminderte prozentuale Anzahl an CD4⁺-Zellen unter Th17-Differenzierung auf im Vergleich zu WT-Mäusen unter Doxycyclingabe. A) Darstellung der prozentualen Anteile von CD4⁺-Zellen. B) Darstellung der absoluten Zellzahlen von CD4⁺-Zellen (*:p=0,05)

Für P2⁺-naive T-Zellen zeigte sich im Vergleich zur WT⁺-Gruppe ein verminderter Anteil an CD4⁺-Zellen in der Th17-Differenzierung (p=0,03, Abb. 9 A). Dabei bestanden jedoch weder bei P2⁺-Zellen noch bei WT⁺-Zellen zu den Kontrollgruppen ohne Doxycyclin statistische Unterschiede. In der Th17-Differenzierung bestand für die WT⁺CD4⁺-Zellzahl eine hohe Varianz im Vergleich zu den restlichen Gruppen (Abb. 9 B). Weitere Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden unter Th1-Differenzierung und Th17- Differenzierung nicht.

Unter Th1-Differenzierung zeigten P2⁺-T-Zellen erhöhte Anteile an IFN- γ ⁺CD4⁺-Zellen im Vergleich zu WT⁺-Zellen sowie der P2-Kontrollgruppe (Abb. 10 A). Dabei stellte sich in allen Gruppen eine starke Streuung der Werte dar. Im Immunoassay war die

IFN- γ -Produktion sowohl von P2- als auch WT-Zellen vergleichbar bei starker Streuung der Werte für die P2-Kontrollgruppe (Abb. 10 B).

In den Versuchen mit P4-Mäusen zeigten sich für WT⁻- sowie P4⁻- Zellen im Vergleich zu den Kontrollen verminderte Anteile an IFN- γ ⁺CD4⁺-T-Zellen (Abb. 10 A). Wie auch für Versuche mit P2-Mäusen war eine starke Streuung der Werte zu beobachten. Im IFN- γ -ELISA zeigte die P4-Kontrollgruppe ebenfalls einen erhöhten Mittelwert und eine starke Streuung der Werte verglichen zu den restlichen Gruppen (Abb. 10 B). Es bestanden somit keine signifikanten Unterschiede für P2- und P4- Gruppen in der Th1-Differenzierung im Vergleich zu WT-Gruppen.

Die Tendenzen von P2-Splenozyten bezüglich einer verminderten IFN- γ -Produktion und Th1-Differenzierung bestätigten sich somit im Versuch mit naiven T-Zellen nicht.

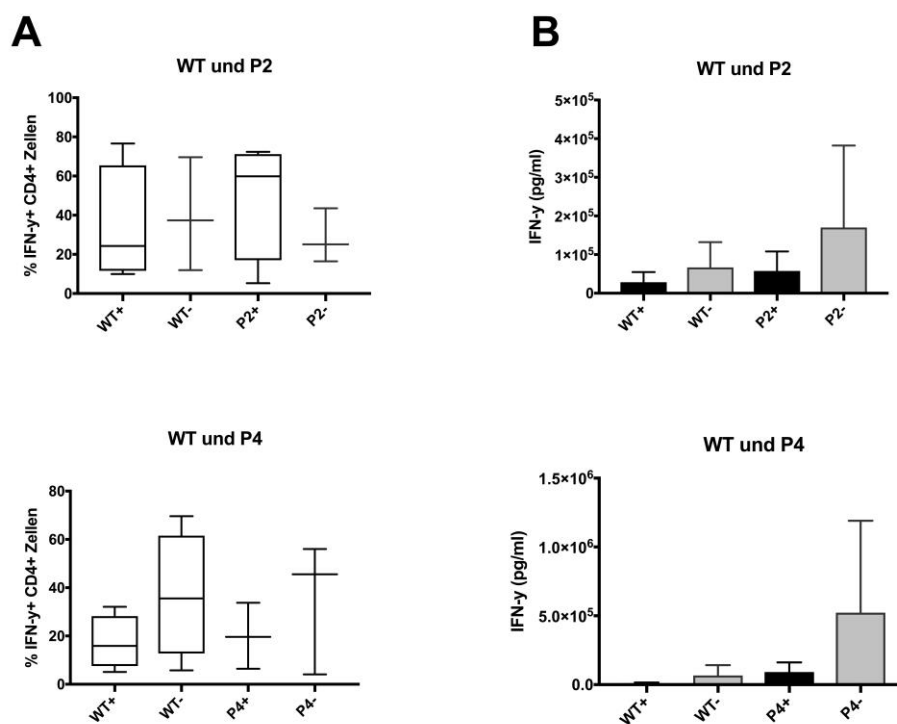


Abbildung 10: Naive T-Zellen unter Th1-Differenzierung. Unter Th1-Differenzierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen naiven CD4⁺-Zellen von P2- bzw. P4-Mäusen zu WT-Mäusen bezüglich der intrazellulären IFN- γ -Produktion (A) in der Flusszytometrie oder der extrazellulär gemessenen IFN- γ -Konzentration (B) mittels Immunoassay. Versuche mit P2-Mäusen beinhalteten 4 Mäuse/Gruppe und für WT-Mäuse 3 Mäuse/Gruppe in der Flusszytometrie und 3 Mäuse im Immunoassay. Versuche mit P4-Mäusen beinhalteten 4 Mäuse/Gruppe und für WT-Mäuse 3 Mäuse/Gruppe in der Flusszytometrie und 2 Mäuse im Immunoassay. Ergebnisse wurden als Mittelwert mit SD angegeben.

In der Th17-Differenzierung bestanden für P2- sowie WT-Zellen in der Flusszytometrie und dem Immunoassay gering erhöhte Mittelwerte im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen (Abb. 11 A). Zudem war eine breite Streuung der Werte in diesen Gruppen erkennbar, auch im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Ein signifikanter Unterschied zwischen P2⁺- und WT⁺-Gruppen sowie zu ihren Kontrollgruppen war weder für die Zelldifferenzierung von Th17-Zellen noch für die Il-17-Produktion nachzuweisen (Abb. 11 A u. B).

Für Versuche bezüglich der Th17-Polarisierung in P4-Mäusen fielen in der Flusszytometrie verminderte Anteile an Th17-Zellen für die WT⁺- und P4⁺-Gruppe auf sowohl absolut als auch relativ zu den Kontrollen ohne Doxycyclin (Abb. 11 A). Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Immunoassay war die Il-17-Produktion der WT-Kontrollgruppe zu den anderen Gruppen deutlich erhöht (Abb. 11 B). In der einfaktoriellen Varianzanalyse des Immunoassays ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT⁺-, P4⁺- und P4⁻-Gruppe ($p=0,04$), jedoch ohne signifikanten Nachtest (Tukey Post-hoc-Test). Auch unter Th17-Differenzierung zeigten sich somit keine signifikanten Unterschiede in der Flusszytometrie oder im Immunoassay zwischen P2- bzw. P4-Knockdown und WT-Mäusen.

Somit konnte auch für naive T-Zellen von WT-, P2- und P4-Mäusen kein Unterschied bezüglich ihrer Th1- oder Th17-Differenzierungseigenschaften nachgewiesen werden.

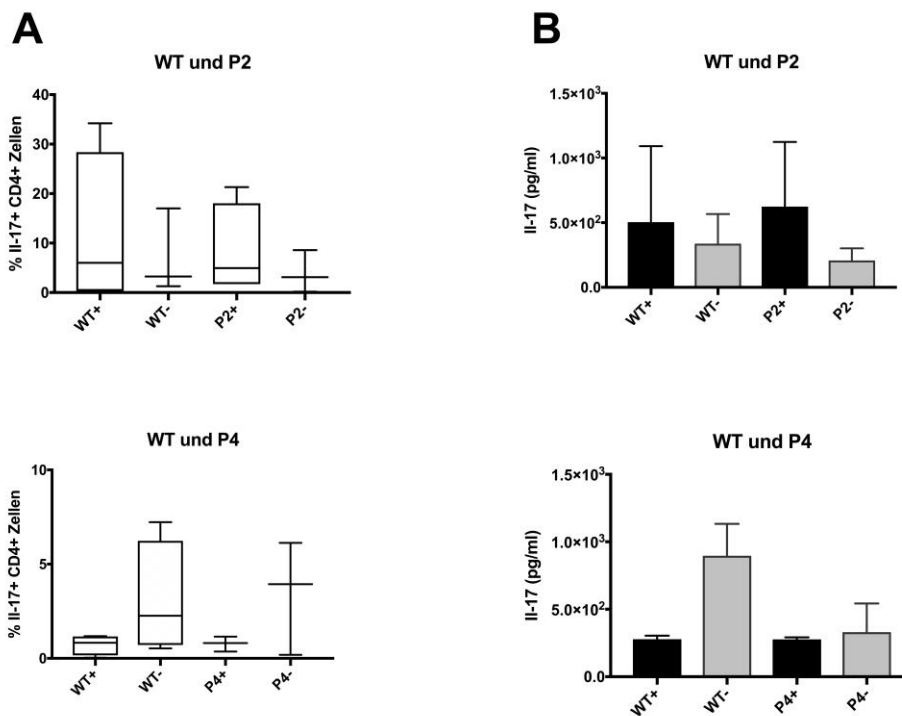


Abbildung 11: Naive T-Zellen unter Th17-Differenzierung. Vergleich von P2-Mäusen bzw. P4-Mäusen zu WT-Mäusen. Unter Th17-Differenzierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen naiven CD4⁺-Zellen von P2- bzw. P4-Mäusen zu WT-Mäusen bezüglich der intrazellulären IL-17-Produktion (A) in der Flusszytometrie oder der extrazellulär gemessenen IL-17-Konzentration (B) mittels Immunoassay. Versuche mit P2-Mäusen beinhalteten 5 Mäuse/Gruppe in der Flusszytometrie und 3 Mäuse im Immunoassay, Versuche mit P4-Mäusen beinhalteten 2 Mäuse/Gruppe. Ergebnisse wurden als Mittelwert mit SD angegeben.

3.1.3 Intrinsische bzw. extrinsische Wirkung des *ptpn22*-KD auf die T-Zellentwicklung

Da ebenfalls beschrieben wurde, dass Lyp-620W einen verstärkenden Einfluss auf die CD28-Signaltransduktion hat [157], wurde ergänzend untersucht, ob der *ptpn22*-Knockdown einen extrinsischen Einfluss auf die Differenzierung von naive T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) hat. Aufgrund des klinischen Schutzes vor T1D sowie den Ergebnissen aus den Versuchen mit P2-Splenozyten sowie des klinischen Schutzes von P2-Mäusen, konzentrierten sich die vorgestellten Versuche auf Ergebnisse mit P2-Mäusen. Hierzu wurden APCs und naive T-Zellen von WT- oder P2-Mäusen in verschiedenen Konstellationen unter Th1- und Th17-Differenzierungen

inkubiert. Im Folgenden werden Gruppen nach Abstammung ihrer APCs und naiven T-Zellen benannt beginnend mit den APC-Zellen.

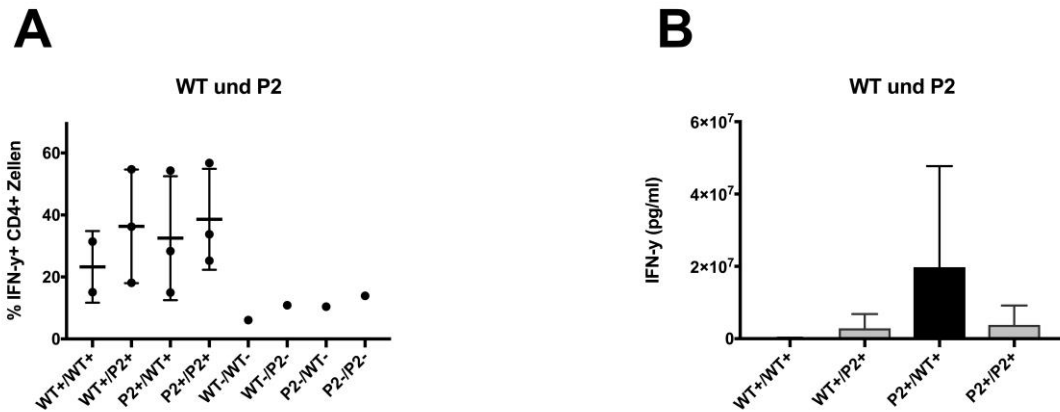


Abbildung 12: Th1-Differenzierung von naiven T-Zellen in Gegenwart von APCs mit und ohne Doxycyclin. Verglichen wurde die intrazelluläre IFN- γ -Produktion (A) sowie die extrazelluläre IFN- γ -Konzentration (B) naiver CD4⁺-Zellen von P2- bzw. WT-Mäusen in Gegenwart von P2- bzw. WT-APCs unter Gabe von Doxycyclin bzw. ohne Doxycyclin. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Bezeichnung geschah wie folgt: 1. Ursprung APCs/2. Ursprung CD4⁺-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte und SD. Die Daten entstammen drei Versuchen.

Für die Th1-Differenzierung zeigten sich erhöhte Mittelwerte für IFN- γ -produzierende CD4⁺-Zellen in mit Doxycyclin behandelten Gruppen im Vergleich zu ihren Kontrollen (Anmerkung: Die Werte für die Kontrollgruppe entstammen demselben Experiment aus dem auch die niedrigsten Werte der mit Doxycyclin behandelten Gruppen stammen, daher besteht nur ein relativ kleiner Unterschied zwischen diesen Gruppen).

Unter den mit Doxycyclin behandelten Mäusen war der Mittelwert der WT/WT-Gruppe am niedrigsten gefolgt von der P2/WT-Gruppe (Abb. 12 A). Die Mittelwerte der Gruppen mit P2-T-Zellen, respektive WT/P2 und P2/P2 waren vergleichbar zueinander und in Bezug auf die Gruppen mit T-Zellen aus WT-Mäusen erhöht.

Auch im Immunoassay war der Mittelwert der WT/WT-Gruppe am niedrigsten (Abb. 12 B). Die Mittelwerte der Gruppen mit P2-T-Zellen waren erneut vergleichbar hoch. Deutlich erhöht zeigten sich die Werte der P2/WT-Gruppe mit einer zudem hohen Streuung der Werte. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen den Gruppen nicht.

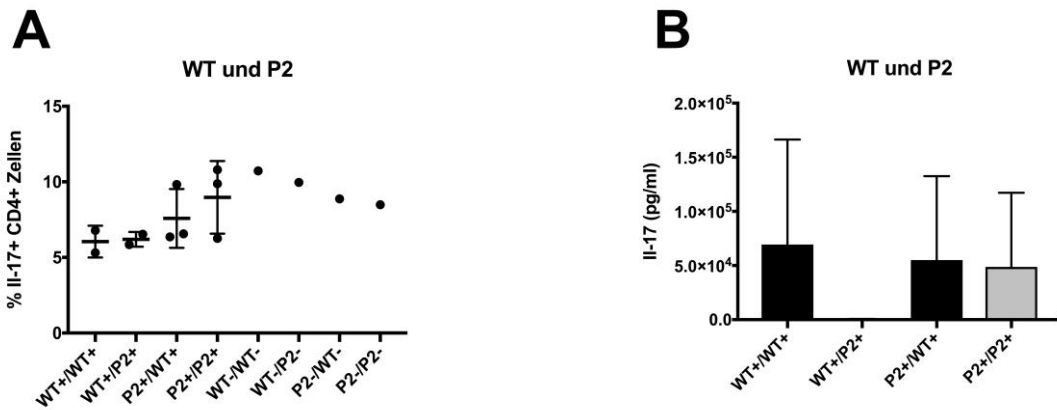


Abbildung 13: Th17-Differenzierung von naiven T-Zellen in Gegenwart von APCs mit und ohne Doxycyclin. Verglichen wurde die intrazelluläre IL-17-Produktion (A) sowie die extrazelluläre IL-17-Konzentration (B) naiver CD4⁺-Zellen von P2- bzw. WT-Mäusen in Gegenwart von P2- bzw. WT-APCs unter Gabe von Doxycyclin bzw. ohne Doxycyclin. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Bezeichnung geschah wie folgt: 1. Herkunft APC/2. Herkunft CD4⁺-Zelle. Angegeben sind Mittelwerte und SD. Die Daten entstammen drei Versuchen.

Unter Th17-Polarisierung ergaben Gruppen mit WT-APCs verminderte Zellfraktionen an IL-17⁺CD4⁺-Zellen als Gruppen mit P2-APCs (Abb. 13 A). Dabei war der Mittelwert der P2/P2-Gruppen am höchsten. Im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen zeigten Gruppen mit WT-APCs verminderte Mittelwerte in der Flusszytometrie; für Gruppen mit P2-APCs stellte sich ein solcher Effekt nicht dar. Mittels Immunoassay war für die WT/P2-Gruppe eine verminderte IL-17-Produktion im Vergleich zu den restlichen Gruppen nachweisbar (Abb. 13 B). Dabei lag in allen Gruppen eine starke Streuung der Werte vor. Auch für die Th17-Differenzierung zeigten sich keine statistisch messbaren Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

So zeigten sich auch in Bezug auf einen extrinsischen Einfluss von PTPN22, vermittelt durch APCs, keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und Knockdown-Gruppen in ihren Eigenschaften bezüglich Th1- und Th17-Differenzierung.

3.1.4 Zusammenfassung

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass weder ein Knockdown von *ptpn22* durch P2-shRNA noch durch P4-shRNA einen intrinsischen oder extrinsischen Effekt auf die Differenzierungseigenschaften von T-Zellen in Th1- oder Th17-Zellen aufwiesen.

Obwohl Einzelversuche (Daten hier nicht gezeigt) auf eine verminderte IFN- γ -Produktion und Th1-Differenzierung von Splenozyten mit P2-Knockdown hinwiesen, konnte dieser Trend weder in Zusammenschau aller Versuche an Splenozyten noch in Versuchen mit naiven T-Zellen bzw. APCs und naiven T-Zellen bestätigt werden.

3.2 PTPN22 und die Suppressivität von Treg-Zellen

Für die periphere Immuntoleranz spielen FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) eine wichtige Rolle [159]. In Typ-1-Diabetes ist die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen beeinträchtigt und fördert die T-Zell-vermittelte Zerstörung von insulinproduzierenden β -Zellen [160]. Es konnte belegt werden, dass Treg-Zellen von gesunden homozygoten Lyp-620W-Trägern eine veränderte Suppressivität auf die Proliferation von naiven CD4-T-Zellen aufweisen [157]. Ebenso wiesen NOD-Mäuse mit P2-Knockdown einen erhöhten Anteil an Treg-Zellen in Milz und Lymphknoten auf [135]. Da der Knockdown von *ptpn22* keinen Einfluss auf die Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen gezeigt hat, war daher der Einfluss auf die periphere Toleranz ein weiterer Ansatz zur Klärung des klinischen Schutzes von P2-Knockdown-Mäusen vor T1D.

Die beschriebenen Versuche wurden mittels Suppression Assays an Teff-Zellen und Th1-Zellen als Responder-Zellen durchgeführt und die Proliferation mittels ³H-Thymidin-Markierung und IFN- γ -Produktion mittels Immunoassay aus dem Überstand der Suppression Assays bestimmt. Die IFN- γ -Produktion korrelierte mit der Proliferation der entsprechend Zellreihe und wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht aufgeführt.

In Versuchen mit Th1-Zellen als Responder-Zellen zeigten sich für P2-Treg-Zellen niedrigere Proliferationsraten im Vergleich zu WT-Treg-Zellen (Abb. 14 B). Dies galt v.a. für die niedrigeren Verdünnungsintervalle. Dabei waren die suppressiven Eigenschaften der Treg-Zellen unabhängig davon, ob diese mit WT- oder P2-Th1-Zellen als Responder-Zellen inkubiert wurden. (Abb. 14 B). Von einem Einfluss der Th1-Zellen auf die Proliferation ist daher nicht auszugehen.

Wurde jedoch die Suppressivität von WT- oder P2-Treg-Zellen auf Th1-Zellen untersucht, stellte sich sowohl für P2- als auch WT-Th1-Zellen eine verminderte Proliferation unter Inkubation mit P2-Treg-Zellen dar, wenn diese im Verhältnis von 1:1 zu Th1-Zellen inkubiert wurden (Abb. 14 A) (($p(\text{P2-Th1})=0,004$, $p(\text{WT-Th1})=0,028$)).

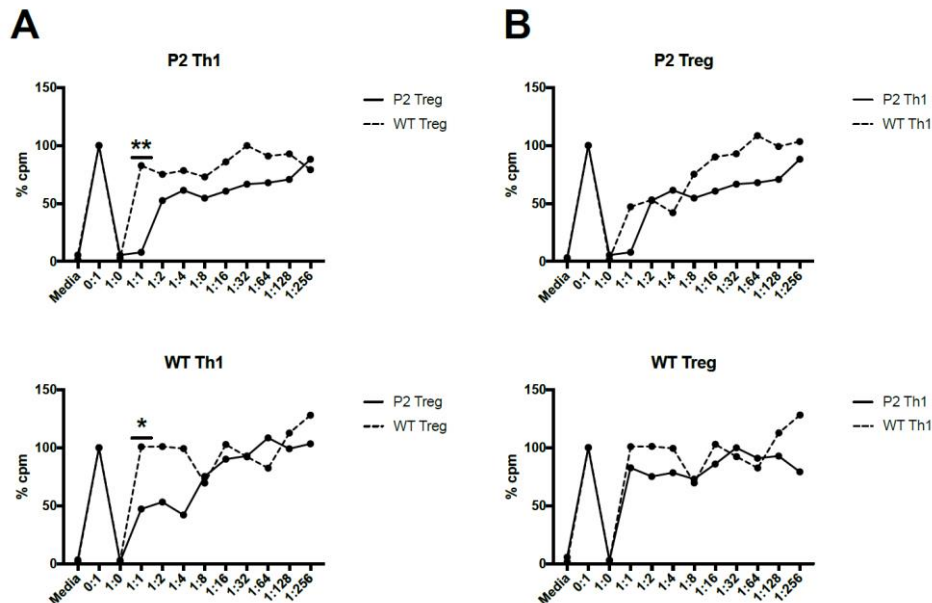


Abbildung 14: Wirkung von Treg-Zellen auf die Proliferation von Th1-Zellen. Abgebildet sind die Suppression Assays durchgeführt mit Th1-Zellen als Responder-Zellen. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Suppression Assays wurden die „counts per minute“ (cpm) prozentual im Verhältnis zum arithmetischen Mittel der Tresp-Zellen(0:1) angegeben und anschließend untereinander verglichen. A) Für ein Treg-Tresp-Verhältnis von 1:1 zeigen P2-Treg-Zellen eine verminderte Proliferation von P2- und WT-Th1-Zellen. B) Die suppressive Wirkung von P2- und WT-Treg-Zellen sind unabhängig von der Herkunft der Th1-Zellen. Abbildungen repräsentieren jeweils einen Versuch pro Assay. Signifikanzen wurden mittels einfaktorier ANOVA und Tukey-Test berechnet (*= $p<0,05$, **= $p<0,01$).

Die Suppression Assays mit Th1-Zellen zeigten zusammenfassend eine stärkere Suppressivität von P2-Treg-Zellen auf Th1-Zellen, wenn das Verhältnis der Zellen zueinander 1:1 betrug. Dieser Effekt war unabhängig vom Maustyp, dem die Th1-Zellen entstammten.

Für Untersuchungen mit Teff-Zellen als Responder-Zellen zeigten sich bis auf das Assay mit WT-Teff- und WT-Treg-Zellen deutlich flachere Anstiege für die

Proliferationskurven als für Versuche mit Th1-Zellen (Siehe Abb. 15 A und B). Dies galt vor allem für die niedrigeren Verdünnungsintervalle (1:1-1:4).

Des Weiteren bestanden für WT-Teff-Zellen niedrigere Proliferationsraten, wenn diese mit P2-Treg-Zellen inkubiert wurden als mit WT-Treg-Zellen (Abb. 15 A unten). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im Vergleich der suppressiven Eigenschaften von WT-Treg-Zellen auf WT- bzw. P2-Teff-Zellen (Abb. 15 B unten). Hier wiesen WT-Teff-Zellen eine höhere Proliferation auf ($p(\text{P2WT}, \text{WTWT})=0,022$, $p(\text{WTP2}, \text{WTWT})=0,024$).

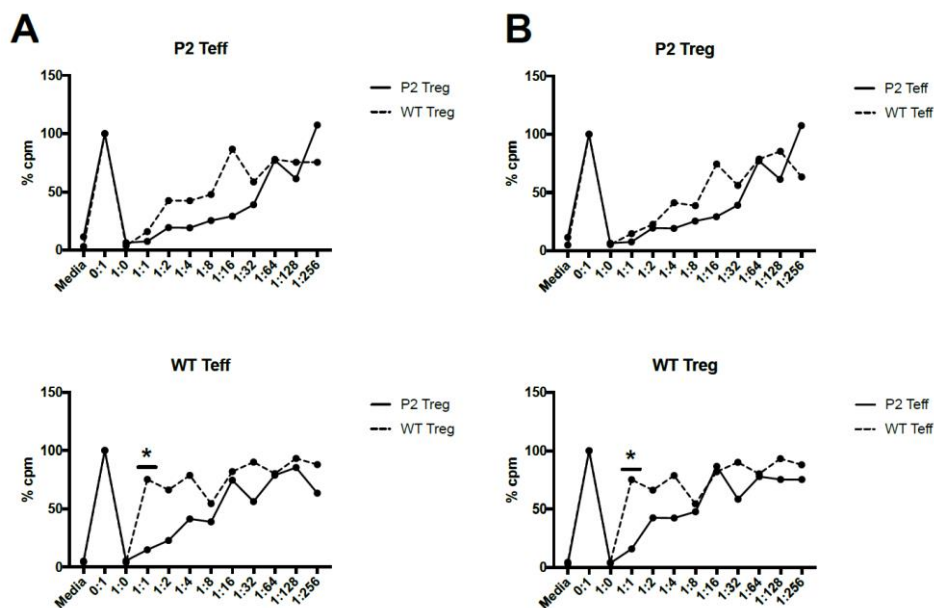


Abbildung 15: Wirkung von Treg-Zellen auf die Proliferation von Teff-Zellen. Abgebildet sind die Suppression Assays durchgeführt mit Teff-Zellen als Tresp-Zellen. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Suppression Assays wurden die „counts per minute“ (cpm) prozentual im Verhältnis zum arithmetischen Mittel der Tresp-Zellen(0:1) angegeben und dann untereinander verglichen. A) Für ein Treg-Tresp-Verhältnis von 1:1 zeigen WT-Teff-Zellen eine verminderte Proliferation unter P2- als unter WT-Treg-Zellen. B) WT-Treg-Zellen haben eine verminderte suppressive Wirkung auf WT-Teff-Zellen im Vergleich zu P2-Teff-Zellen. Abbildungen repräsentieren jeweils einen Versuch pro Assay. Signifikanzen wurden mittels einfaktorier ANOVA und Tukey-Test berechnet (*= $p<0,05$, **= $p<0,01$)

In Bezug auf die Proliferation von T-Effektor(Teff)-Zellen zeigten Treg-Zellen von P2-Mäusen eine stärkere suppressive Wirkung auf WT- sowie P2-Zellen, wobei sich eine signifikant verminderte Suppression der Proliferation von WT-Teff-Zellen durch WT-Treg-Zellen ergab im Vergleich zu P2-Treg-Zellen. Im Vergleich der suppressiven

Eigenschaften von P2- und WT-Treg-Zellen in Abhängigkeit von den proliferierenden T-eff-Zellen, zeigte sich für P2-Treg-Zellen kein Unterschied, ob diese mit WT- oder P2-T-eff-Zellen inkubiert wurden, jedoch wiesen WT-Treg-Zellen einen signifikant verminderte Suppressivität auf die Proliferation von WT-Teff-Zellen auf und somit eine Abhängigkeit der suppressiven Eigenschaften vom Teff-Zelltyp.

Diese Abhängigkeit der verminderten Suppressivität von WT-Treg-Zellen auf WT-Teff-Zellen sowie Th1-Zellen wird im Diskussionsteil genauer behandelt.

3.3 PTPN22 und die Zellverteilung während der Insulitis

Die vorherigen Versuche bezogen sich ausschließlich auf die *in-vitro*-Eigenschaften von T-Zellen in Milz und Lymphknoten von NOD-Mäusen. Da sich die Prozesse, die bei T1D zum β -Zelluntergang führen, jedoch auf das Pankreas bzw. die Langerhans-Inseln und die pankreatischen Lymphknoten konzentrieren, ist es für das pathologische Verständnis relevant die Zellzusammensetzung in diesen Organen zu analysieren.

Dies ist von besonderer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass PTPN22-Überexpression in NOD-Mäusen zu einer veränderten Zellzusammensetzung mit verminderten IFN- γ^+ -T-Zellen in Langerhans-Inseln führte und betroffene NOD-Mäuse eine niedrigere Rate an spontanem T1D aufwiesen [136].

Pankreas, pankreatische Lymphknoten und Milz von WT-NOD-Mäusen (N=7, 3 Monate alt, Doxycyclingabe für 1 Monat) und P2-Knockdown-NOD-Mäusen (N=7, 3 Monate alt, Doxycyclingabe für 1 Monat) wurden mittels Flusszytometrie auf Zellzusammensetzung (CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen, Treg-Zellen, B-Zellen, CXCR3-Expression) bzw. nach Restimulierung auf IFN- γ - und Il-17-Produktion (CD4⁺ und CD8⁺) untersucht.

Pankreata von P2-Mäusen wiesen verminderte Anteile an $CD4^+$ - ($p=0,0013$) sowie $CD8^+$ -Zellen ($p=0,005$) auf (Abb. 16 A). Dies galt auch für $IFN-\gamma^+CD4^+$ -Zellen ($p=0,015$, Abb. 16 B). $IL-17^+CD4^+$ -Zellen waren hingegen im Vergleich zu WT-Mäusen nicht verändert. Für die CXCR3-Exprimierung auf $CD4^+$ -Zellen ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, jedoch lagen in P2-Mäusen ein um den Faktor zehn erhöhter Wert an $CD4^+$ -Zellen vor (siehe Abb. 16 B).

Die Anteile an Treg-Zellen in Pankreata von P2-Mäusen waren im Vergleich zu WT-Mäusen nicht signifikant verändert. Jedoch ergab sich für P2-Treg-Zellen ein erhöhter Mittelwert mit einer ausgeprägten Streuung der Werte im Vergleich zu WT-Mäusen (Abb. 16 C).

Im Verhältnis zu Teff-Zellen zeigte sich jeweils für $IFN-\gamma^+CD4^+$ -Zellen als auch $CD8^+$ -Zellen ein zu Treg-Zellen verschobenes Verhältnis in P2-Mäusen ($p(IFN-\gamma^+CD4^+)=0,026$; $p(CD8^+)=0,002$), (Abb. 16 D).

Für $B220^+$ -Zellen zeigte sich zwar ein verminderter Mittelwert in P2-Mäusen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu WT-Mäusen (Abb. 16 E).

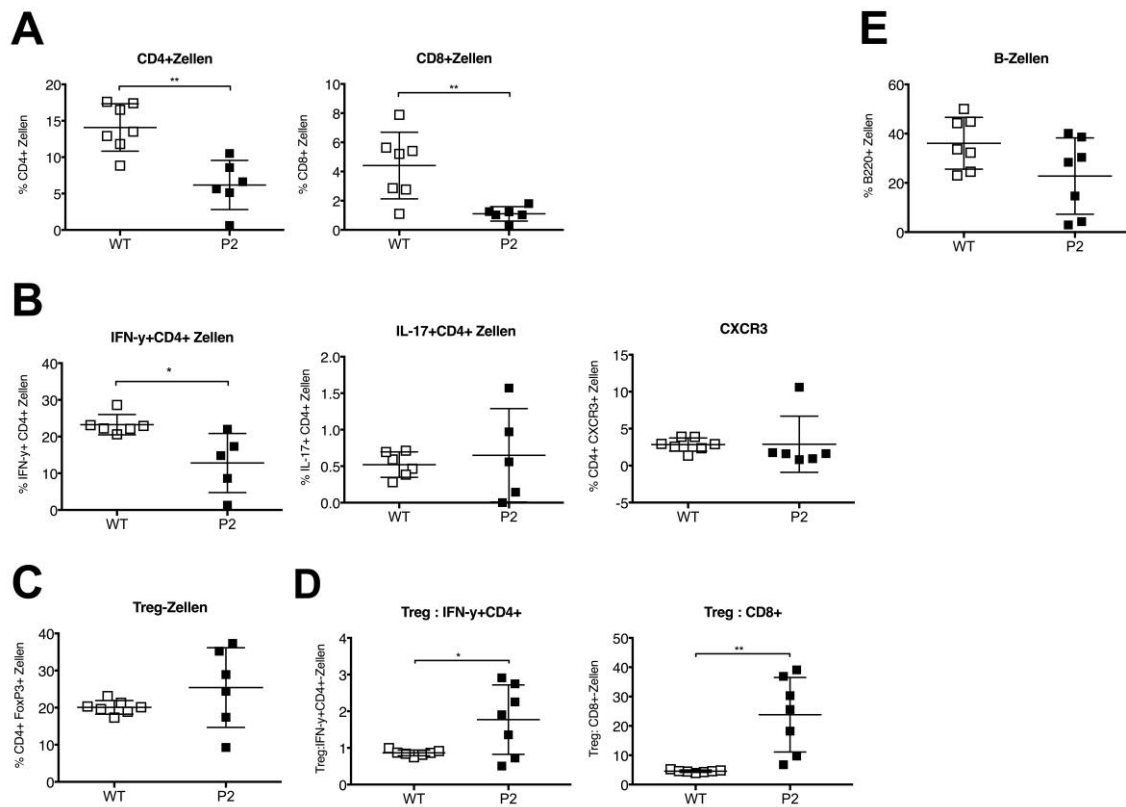


Abbildung 16: Einfluss von PTPN22-Stillelegung auf die *in-vivo*-Verteilung und Zytokinproduktion von Immunzellen im Pankreas. WT- und P2-Mäuse waren bei Versuchsdurchführung drei Monate alt und erhielten zuvor Doxyzyklin für zwei Monate. A) P2-Mäuse weisen verminderte Anteile an CD4⁺- und CD8⁺-Zellen. B) IFN- γ , jedoch nicht IL-17-Produktion oder CXCR3-Expression von CD4⁺-Zellen ist in P2-Mäusen vermindert. C) Der Anteil an FoxP3⁺-Treg-Zellen wird durch den P2-Knockdown nicht verändert. D) Das Verhältnis von Treg-Zellen zu IFN- γ -produzierenden CD4⁺-Zellen bzw. CD8⁺-Zellen ist in P2-Mäusen erhöht. E) Der Anteil an B-Zellen wird durch den P2-Knockdown nicht beeinflusst. Die Ergebnisse entstammen einem Versuch. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Es wurden Mittelwert und SD angegeben. (*:p=0,05, **:p=0,005 ***:p=0,001 ****:p<0,001)

Für pankreatische Lymphknoten von P2-Mäusen ergab sich ebenfalls ein verminderter Anteil an CD8⁺-Zellen (p=0,006), jedoch war der Anteil an CD4⁺-Zellen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht (p=0,017, Abb. 17 A).

Für IFN- γ - sowie Il-17-Expression von CD4⁺-Zellen lagen in P2-Mäusen jeweils niedrigere Mittelwerte vor. Die Anteile waren jedoch bei hohen Ausreißern in pankreatischen Lymphknoten von P2-Mäusen nicht signifikant verändert (Abb. 17 B). Die IFN- γ -Expression von CD8⁺-Zellen zeigte unveränderte Werte zwischen den Mäusen.

Die CXCR3-Expression auf CD4⁺-Zellen von P2-Mäusen war in pLNs im Vergleich zu WT-Mäusen nicht verändert.

Wie in Pankreata von P2-Mäusen lagen auch in pankreatischen Lymphknoten erhöhte Werte für Treg-Zellen vor, jedoch ohne signifikante Veränderung bei deutlich vermindertem Mittelwert (Abb. 17 C). Das Verhältnis von Treg-Zellen zu IFN- γ ⁺CD4⁺- sowie CD8⁺-Zellen zeigte sich signifikant erhöht in P2-Mäusen (p(IFN- γ ⁺CD4⁺)<0,0001, p(IFN- γ ⁺CD8⁺)=0,99; p(CD8⁺)=0,0001), das Verhältnis von Treg-Zellen zu IFN- γ ⁺CD8⁺-Zellen war hingegen unverändert im Vergleich zu WT-Mäusen (Abb. 17 D).

Im Gegensatz zu Pankreata lagen in pankreatischen Lymphknoten signifikant höhere Anteile an B220⁺-Zellen in P2-Mäusen vor (p<0,001, Abb. 17 E).

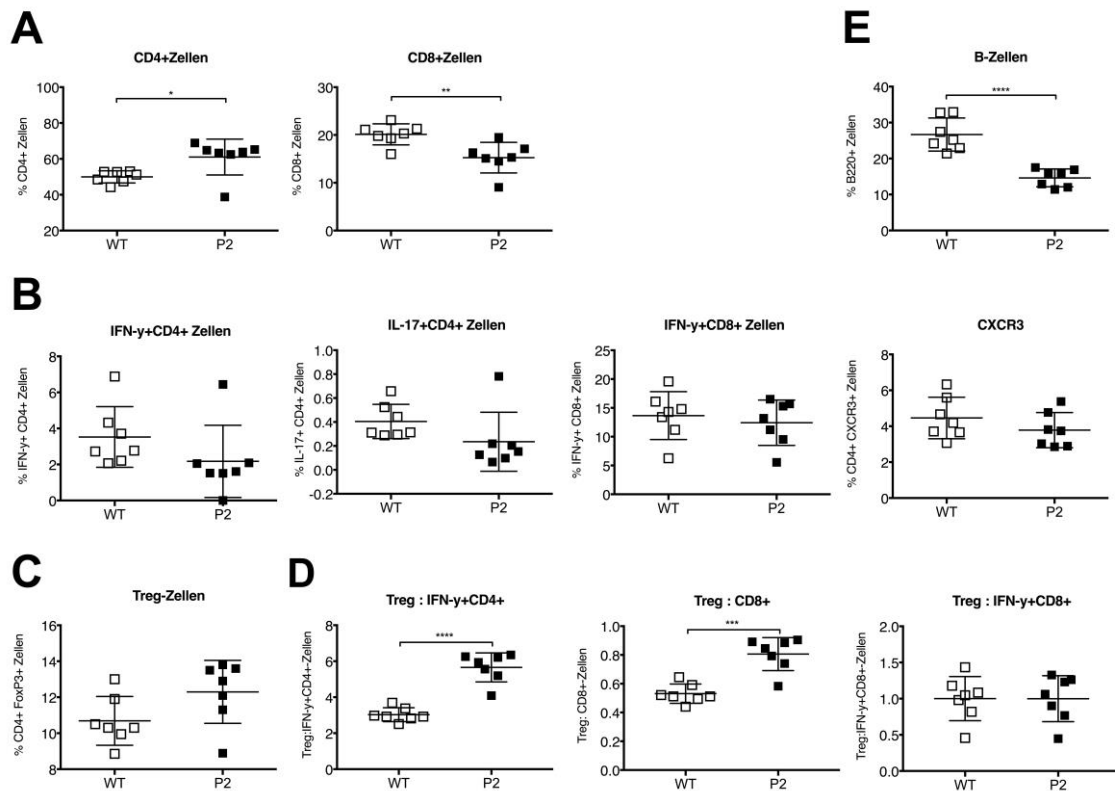


Abbildung 17: Einfluss von PTPN22-Stilleung auf die *in-vivo*-Verteilung und Zytokinproduktion von Immunzellen im pankreatischen Lymphknoten. WT- und P2-Mäuse waren bei Versuchsdurchführung drei Monate alt und erhielten zuvor Doxyzyklin für zwei Monate. A) P2-Knockdown führt zu einem erhöhten Anteil an CD4⁺, jedoch einem verminderten Anteil an CD8⁺-Zellen. B) P2-Knockdown hat keinen Einfluss auf die IFN- γ - und IL-17-Produktion sowie CXCR3-Expression von CD4⁺-Zellen bzw. die IFN- γ -Produktion von CD8⁺-Zellen. C) Der Anteil an Treg-Zellen wird durch P2-Knockdown nicht beeinflusst. D) P2-Knockdown führt zu einem erhöhtem Verhältnis von Treg-Zellen zu IFN- γ -produzierenden CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, das Verhältnis von Treg-Zellen zu IFN- γ +CD8⁺-Zellen ist jedoch nicht beeinflusst. E) Der Anteil an B-Zellen ist durch den P2-Knockdown vermindert. Die Ergebnisse entstammen einem Versuch. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Es wurden Mittelwert und SD angegeben. (*:p=0,05, **:p=0,005 ***:p=0,001 ****:p<0,001)

In der Milz von P2-Mäusen war der Anteil an Teff-Zellen sowohl von CD4⁺- (p<0,001) als auch von CD8⁺-T-Zellen (p<0,001) vermindert (Abb. 18 A).

Nach Restimulation zeigte sich für die IFN- γ -Expression in CD4⁺-Zellen kein Unterschied im Vergleich von P2-Mäusen zu WT⁺-Mäusen, jedoch war die Anzahl an IL-17⁺CD4⁺-Zellen vermindert (p=0,033, Abb. 18 B). Für CD8⁺-Zellen zeigte sich der Anteil an IFN- γ ⁺-Zellen erhöht (p=0,01), in Zusammenschau mit der verminderten CD8-Zellzahl ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede für die absolute Anzahl an IFN- γ ⁺CD8⁺-Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit war zwar der prozentuale Anteil an IFN- γ ⁺CD8⁺-Zellen in P2-Mäusen erhöht, dieser Unterschied wurde jedoch durch die verminderte Anzahl an CD8⁺-Zellen ausgeglichen.

Die CXCR3-Expression auf CD4⁺-Zellen war in der Milz von WT- und P2-Mäusen nicht verändert.

Im Gegensatz zu CD4⁺- sowie CD8⁺-Zellen war der Anteil an Treg-Zellen in der Milz von P2-Mäusen erhöht (p=0,006, Abb. 18 C). Dies galt ebenfalls für das Verhältnis von Treg-Zellen zu IFN- γ ⁺CD4⁺-Zellen (p=0,0005) sowie zu CD8⁺-Zellen (p<0,0001), für IFN- γ ⁺CD8⁺-Zellen alleine war dieses Verhältnis jedoch vermindert (p<0,0001) (Abb. 18 D).

Ebenso wie in pankreatischen Lymphknoten war der Anteil an B220⁺-Zellen in der Milz von P2-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen erhöht (p<0,001, Abb. 18 E).

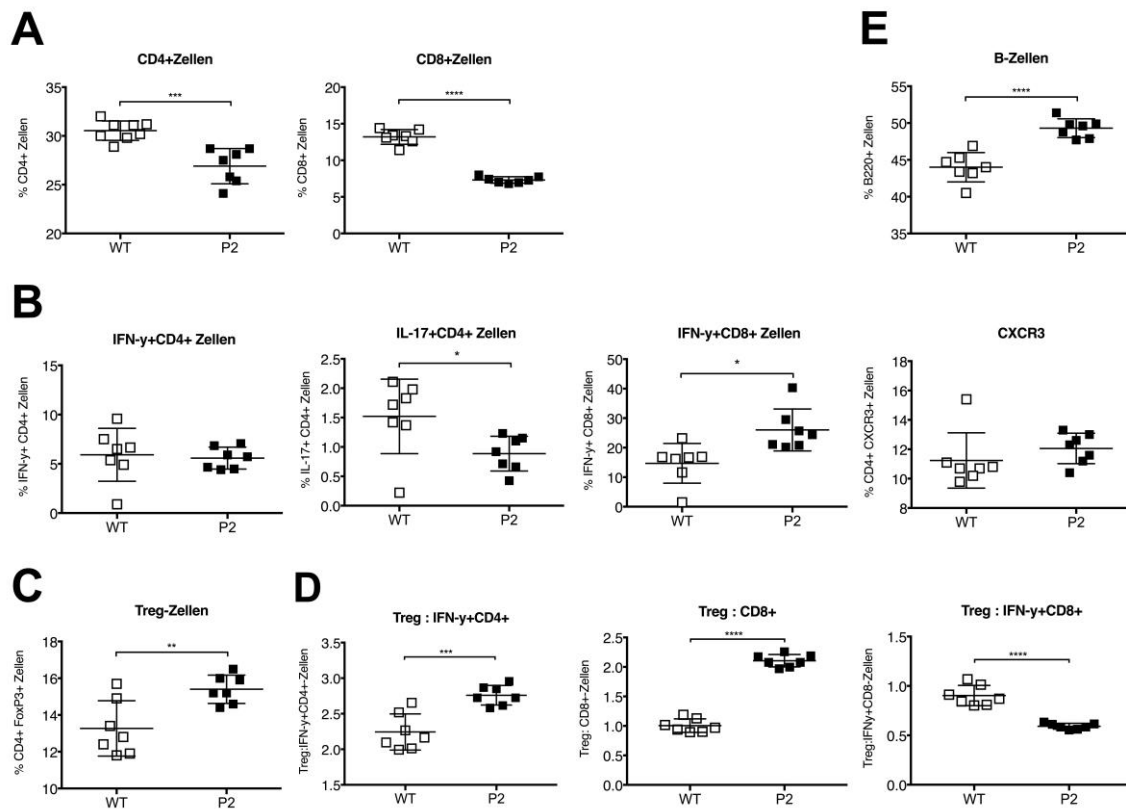


Abbildung 18: Einfluss von PTPN22-Stillelegung auf die *in-vivo*-Verteilung und Zytokinproduktion von Immunzellen in der Milz. WT- und P2-Mäuse waren bei Versuchsdurchführung drei Monate alt und erhielten zuvor Doxyzyklin für zwei Monate. A) Der Anteil an CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in P2-Mäusen ist vermindert. B) P2-Knockdown führt zu einem verminderten Anteil an IL-17⁺CD4⁺-Zellen sowie einem erhöhten Anteil an IFN-γ⁺CD8⁺-Zellen. C) Der Anteil an Treg-Zellen ist in P2-Mäusen erhöht. D) Das Verhältnis von Treg-Zellen zu IFN-γ-produzierenden CD4⁺- sowie dem Anteil an CD8⁺-Zellen ist erhöht, jedoch für IFN-γ-produzierende CD8⁺-Zellen vermindert. E) Der Anteil an B-Zellen wird durch P2-Knockdown erhöht. Die Ergebnisse entstammen einem Versuch. Jeder Punkt entspricht einem Tier. Es wurden Mittelwert und SD angegeben. (*:p=0,05, **:p=0,005, ***:p=0,001, ****:p<0,001)

Ein Stilllegen von *ptpn22* durch den P2-Knockdown führte somit zu einer deutlichen Veränderung der Zellzusammensetzung wie auch der Anteile an IFN- γ - und IL-17-produzierenden T-Zellen von Milz, Pankreas und pankreatischen Lymphknoten im NOD-Mausmodell. Bei einem Teil der Ergebnisse führten einzelne stark abweichende Werte trotz sonst deutlichem Trend bezüglich unterschiedlicher Grundgesamtheiten dazu, dass ein statistischer Unterschied nicht nachgewiesen wurde.

Im Gegensatz zum Differenzierungsversuch zeigten sich in der Milz von P2-Mäusen erhöhte CD4⁺-Zellzahlen im Vergleich zu WT-Mäusen. Ebenfalls waren verminderte IL-17⁺CD4⁺-Zellen in der Milz von P2-Mäusen nachzuweisen. Dagegen waren IFN- γ ⁺CD4⁺-Zellfraktionen zu WT-Mäusen statistisch nicht verändert. Jedoch waren die untersuchten Tiere im Insulitisversuch deutlich älter und erhielten Doxycyclin über einen längeren Zeitraum als Mäuse in den Differenzierungsversuchen.

4. Diskussion

Ptpn22 kodiert für die Phosphatase Lyp im Menschen und PEP in der Maus. Diese sind als negative Regulatoren der proximalen TCR-Signaltransduktion an der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen mitbeteiligt. In GWAS konnte eine „gain-of-function“-Variante von PTPN22, LYP-R620W, identifiziert werden, die mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen, u.a. T1D assoziiert ist. In Prof. Kisslers Labor wurden zwei transgenetische NOD-Mauslinien, P2- und P4-Mäuse, erstellt in denen die PTPN22-Expression mittels Doxycyclin-Gabe unterbunden werden kann. Klinisch wiesen P2-Mäuse dabei im Vergleich zu P4-Mäusen und WT-Mäusen einen Schutz vor T1D auf. Diese Arbeit konzentrierte sich auf mögliche zelluläre Ursachen, die P2-Mäuse vor T1D schützten.

Anhand von *in-vitro*-Versuchen mit Splenozyten und naiven T-Zellen, ohne und mit Zugabe von APCs, konnte nachgewiesen werden, dass unter den vorliegenden Versuchsbedingungen *ptpn22*-KD weder einen intrinsischen noch extrinsischen Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen in Th1- oder Th17 -Zellen hatte.

Mittels Suppression Assays konnte gezeigt werden, dass Treg-Zellen aus P2-Mäusen eine stärkere Unterdrückung der Proliferation von Tresp-Zellen bewirken als Treg-Zellen aus WT-Mäusen, abhängig von einer ausgeglichenen Anzahl an Treg-Zellen und Tresp-Zellen.

Von Bedeutung war zudem die unterschiedliche *in-vivo*-Zellverteilung zwischen P2-Mäusen und WT-Mäusen während des Insulitisstadiums. Hier zeigten sich verminderte CD8⁺-Zellanteile in allen untersuchten Organen (Pankreas, pankreatische Lymphknoten und Milz) von P2-Mäusen. Ebenfalls waren im Pankreas IFN- γ ⁺CD4⁺-Zellen vermindert und das Verhältnis von Treg-Zellen zu CD8⁺- bzw. IFN- γ ⁺CD4⁺-Zellen zu Gunsten von Treg-Zellen verschoben.

4.1 T-Zell Differenzierung in Th1- und Th17-Zellen

Zur Durchführung der Versuche wurden Lymphozyten *in vitro* unter vorher getesteten Differenzierungsverhältnissen (Daten nicht gezeigt) auf ihre Polarisierungseigenschaften hin zu Th1- und Th17-Zellen getestet. Hierzu wurde mittels Flusszytometrie und Immunoassay die Produktion von IFN- γ und Il-17A bestimmt. Die Experimente wurden in fünf Einzelversuchen durchgeführt, wobei pro Versuch ein bis

zwei Mäuse pro Gruppe - respektive WT-Mäuse, P2- und/oder P4-Mäuse mit und ohne Doxycyclin genutzt wurden. In den Einzelversuchen wurden, wenn die Versuchsgruppe aus zwei Mäusen bestand, Zellen gepoolt und zusammen inkubiert.

Für die Aussagekraft der Befunde muss beachtet werden, dass aufgrund der kleinen Fallzahlen eine verminderte Teststärke besteht.

Ein weiterer, bedeutsamer Faktor ist, dass die Zellen für die Versuche an Splenozyten, naiven T-Zellen und bezüglich des Einflusses verschiedener APCs auf naive T-Zellen aus denselben Mäusen stammen, somit aus ein bis zwei Mäusen pro Gruppe drei verschiedene Experimente angesetzt wurden. Dies könnte bedeuten, dass bei den vorliegenden kleinen Fallzahlen der individuelle Einfluss der einzelnen Mäuse einen Effekt nicht nur auf die einzelnen Experimente eines Zelltyps, sondern auch auf die Versuchsreihen untereinander hat und somit eine Abhängigkeit der Werte bzw. Ergebnisse geschaffen wurde.

Für die Versuche wurden vorrangig männliche Mäuse ausgewählt. Da die Expressierung von PTPN22 sowie die Funktion des genutzten Knockdowns für *ptpn22* geschlechterunspezifisch ist, wurde für die Versuche bezüglich der Differenzierungseigenschaften von naiven T-Zellen kein Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse angenommen. Jedoch fiel auf, dass in einem Versuch (Daten nicht gezeigt), in dem weibliche Mäuse genutzt wurden, signifikant niedrigere Werte für IFN- γ in der Flusszytometrie sowie im Immunoassay gemessen wurden. Daher stellt sich die Frage, ob dieses Ergebnis auf das Geschlecht oder das individuelle Tier zurückzuführen waren, auch vor dem Hintergrund, dass weibliche Mäuse häufiger T1D entwickeln als männliche NOD-Mäuse. In NOD-Mäusen konnte durch Überexpression von PTPN22 eine verminderte Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1-Zellen nachgewiesen werden, wobei lediglich weibliche Mäuse genutzt wurden. Dies könnte ein weiterer Hinweis für einen Einfluss des Geschlechts auf die Wirkung von PTPN22 darstellen [136].

Interessanterweise konnte eine weitere Studie nachweisen, dass die Risikovariante von PTPN22 häufiger in weiblichen T1D-Patienten vorkam als in männlichen [161].

Für die Polarisierungsversuche wurden Zellen aus Milz und Lymphknoten (inguinal, mediastinal, axillär und zervikal) von 5-7 Wochen alten Mäusen gewonnen. Im NOD-Mausmodell entspricht dieser Zeitpunkt bereits dem Stadium der nicht-destruktiven

Insulinitis, also dem Einwandern von Lymphozyten in den Pankreas vorerst ohne damit einhergehende Zellzerstörung [58]. Daher stellt sich die Frage, ob zu diesem Zeitpunkt die pathogenen T-Zellen bereits in pankreatischen Lymphknoten und Pankreas abgewandert sind und sich daher von der Population zirkulierender Lymphozyten unterscheiden [65], aus der die gewonnenen Zellen für die Versuche entstammen.

Obwohl unter *in-vitro*-Polarisierung Th1-Zellen nur sehr geringe Mengen an Il-17 und Th17-Zellen ebenfalls nur minimale Mengen an IFN- γ exprimierten, bleibt offen, ob die Differenzierungsbedingungen der *in-vitro*-Versuche das reelle Zytokinmuster, dem die Lymphozyten in der NOD-Maus ausgesetzt sind, widerspiegeln. Dies hat gerade aufgrund der Plastizität von Th17-Zellen und aufgrund der Pathogenität von IFN- γ -produzierenden Th17-Zellen für T1D eine besondere Bedeutung. Hinzu kommt, dass die Polarisierungen über die Produktion von Zytokinen und nicht über die Expression von Transkriptionsfaktoren, wie T-Bet für Th1-Differenzierung und ROR γ t für Th17-Expression bestimmt wurde. Eine sichere Aussage über die vorliegende T-Helfer-Population bzw. ihre Zusammensetzung ist somit nicht vollständig möglich.

Da PTPN22 eine regulierende Wirkung auf die TCR-Signalstärke hat, muss ebenfalls der Schwellenwert an Antigen beachtet werden, der für eine TCR-vermittelte Aktivierung der Zelle nötig ist. Daher ist neben der Konzentration von PTPN22 auch die Konzentration von aCD3 von Bedeutung, die für die Versuche genutzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass eine schwache TCR-Aktivierung in *ptpn22*-KO-Mäusen zu verstärkter Th1-Differenzierung führt [162]. Obwohl die gewählte aCD3-Konzentration vergleichbar war mit Konzentrationen, die in Versuchen von anderen Forschungsgruppen genutzt wurden, stellt sich trotzdem die Frage, ab welcher aCD3-Konzentration sich ein Unterschied in der TCR-Aktivierung zwischen WT-Mäusen und P2-Mäusen, abzeichnet. Diese Frage kann mit einer festgelegten Konzentration an aCD3 nicht beantwortet werden und bleibt somit offen.

Die Knockdown-Initiierung wurde mittels Zugabe von Doxycyclin zum Trinkwasser der Mäuse durchgeführt. Hierbei betrug die Konzentration 50 μ g/mL. Vorangehende Versuche von Zheng und Kissler wurden mit einer Konzentration von 200 μ g/mL Doxycyclin durchgeführt. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass bereits ab einer Konzentration von 2 bzw. 20 μ g/mL ein suffizienter Knockdown initiiert werden konnte

[135]. Ebenfalls zeigten die Ergebnisse aus dem Insulinitis-Versuch (Kapitel 4.3) und weiteren Experimenten [163], dass eine Konzentration von 50 µg/mL zu signifikanten Ergebnissen führte.

Die Dauer der Doxycyclingabe lag bei 9-14 Tagen pro Versuch. Die Tiere waren dabei im Mittel 5-7 Wochen alt. Knockdown-Validierung wurde von Zheng und Kissler mittels qRT-PCR an 5-7 Wochen alten Mäusen durchgeführt, die Doxycyclin für 7-10 Tage erhielten [135]. Aus diesen Ergebnissen ist auch ohne eigens durchgeführte Testung ersichtlich, dass unter der für die Versuche gewählten Dauer und Konzentration der Doxycyclingabe sowie dem Alter der Mäuse ein suffizienter Knockdown von *ptpn22* gegeben sein sollte. Jedoch konnten Zheng und Kissler nachweisen, dass *in vivo* die Dauer von 10-14 Tagen nicht ausreichend war um eine unterschiedliche Organverteilung von Immunzellen nachzuweisen [135]. Fraglich ist jedoch, ob selbst bei suffizientem Knockdown das Alter der Mäuse einen ausschlaggebenden Effekt auf die Differenzierung von naiven T-Zellen hat. Zheng und Kissler konnten nachweisen, dass transgenetisch veränderte Mäuse, die ab Geburt für zwei Monate Doxycyclin erhielten eine vermehrte Anzahl an Teff-Zellen aufwiesen im Vergleich zu Mäusen, die Doxycyclin ab einem Alter von 6 Wochen für 3 Monate erhielten [135]. Hieraus ließe sich möglicherweise ableiten, dass eine frühere Gabe von Doxycyclin einen veränderten Effekt auf die Th1- oder Th17-Differenzierung von P2- bzw. P4-Mäusen hat. Da jedoch in P2-Mäusen ein klinischer Schutz vor T1D durch eine Knockdown-Initiierung ab der 5. bzw. 11. Lebenswoche gegeben war [135], könnten die Befunde der Differenzierungsversuche darauf hinweisen, dass dieser Schutz unabhängig von der Th1-Differenzierung ist.

Dass *ptpn22*-Knockdown keinen Einfluss auf die Th1-Differenzierungseigenschaften von naiven T-Zellen besaß, konnte ebenfalls in anderen Studien beobachtet werden. So fanden Fousteri et al. in *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuchen für naive T-Zellen aus *ptpn22*-KO-Mäusen keine signifikanten Veränderungen in der Th1--Zelldifferenzierung [162]. Auch naive T-Zellen von gesunden Trägern von Lyp-620W wiesen weder *in vitro* noch *in vivo* veränderte proliferative Eigenschaften für Th1-Zellen auf im Vergleich zu Probanden ohne Risikoallel [164]. Dies wäre konform mit den Ergebnissen aus der durchgeführten Th1-Polarisierung und bekräftigt, trotz der kleinen Versuchsgruppen, dass PTPN22 keinen Einfluss auf die Polarisierung von T-Zellen zu Th1-Zellen hat.

In Versuchen mit gesunden Trägern des Risikoallels von *ptpn22* fiel jedoch auf, dass diese eine verstärkte Th1-Antwort sowie verlängertes Überleben von Th1-effektor-Gedächtniszellen aufwiesen. Dies war mit einer veränderten Aktivierung des AKT-Signalwegs assoziiert [164]. Eine Suppression von PTPN22 hingegen führte zu einer verstärkten Apoptose [165].

Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen wurde beschrieben, dass eine Überexpression von PTPN22 in NOD-Mäusen zu einer verminderten Th1-Differenzierung und Proliferation sowie klinischem Schutz vor Diabetes führt [136].

Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die 620W-Variante von Lyp bzw. Pep nicht gleichzusetzen ist mit einer Überexpression des Enzyms, sondern einer veränderten Bindung an CSK und somit veränderten Aktivität des Enzyms [124, 126, 135]. Aufgrund der nicht zur vorangegangenen Diskussion passenden Ergebnisse dieser Studie ist daher davon auszugehen, dass Lyp-620W nicht als eine einfache PTPN22-Überexpression zu verstehen ist. Trotzdem sollten diese Befunde hier erwähnt werden, denn sie sind ein Hinweis darauf, dass PTPN22 neben der Regulierung des TCR-Signals Bedeutung in weiteren Bereichen der Zellaktivierung hat, wie z.B. für das angeborene Immunsystem [146] mit anschließender T-Bet Induktion [166, 167], Zytokinproduktion [168] sowie Signalsteuerung durch TLRs [146]. Zudem ergibt sich die Frage der Vergleichbarkeit der Versuche, da das NOD-Mausmodell zwar zentrale pathologische Prozesse mit dem Menschen teilt, jedoch auch Unterschiede zwischen Mensch und Maus vorliegen [169, 170].

Auch für die Polarisierungseigenschaften von T-Zellen zu Th17-Zellen zeigten sich in den durchgeführten Versuchen keine Unterschiede zwischen Knockdown- und WT-Mäusen. Wie bereits für die Th1-Differenzierung, muss hierbei auch die Stärke des TCR-Signals beachtet werden. Da sich die Etablierung optimaler Bedingungen für die Th17-Polarisierung vor Beginn der Versuche als schwierig gestaltete (Daten nicht gezeigt), mussten die Konzentration an aCD3 deutlich erhöht werden. Ein hohes TCR-Signal kann wiederum Unterschiede in der TCR-Aktivierung zwischen *ptpn22*-Knockdown und WT-Mäusen verschleiern und so die Befunde beeinflussen. Literaturrecherchen ergaben für die Suche nach Zusammenhängen bezüglich PTPN22 und Th17-Differenzierung nur sehr wenige Ergebnisse. In Versuchen mit SKG-Mäusen war durch *ptpn22*-KO die *in vitro* Th17-Differenzierung von naiven T-Zellen

vermindert [171]. SKG-Mäuse exprimieren eine deutlich verminderte Menge an ZAP70. Da ZAP70 direktes Substrat von PTPN22 ist sowie von Lck, dessen Aktivität wiederum durch PTPN22 reguliert wird, stellt sich somit ein deutlich stärkerer Einfluss von PTPN22 auf die TCR-Signalkaskade in diesen Mäusen dar. Es konnte im Zuge der beschriebenen Versuche ebenfalls eine erhöhte Produktion von Il-2 in T-Zellen der SKG-*ptpn22*-KO-Mäuse nachgewiesen werden, welches hemmend auf die Th17-Polarisierung wirkt [172]. Dies könnte eine Erklärung für die Beobachtungen in den Versuchen mit SKG-Mäusen darstellen. In Hinblick auf die Th1-Differenzierungen wäre ebenfalls diskutabel, ob *ptpn22*-Silencing ebenfalls keinen Einfluss auf die Th17-Differenzierung hat.

Da T1D eine v.a. Th1- und CD8-Zell-vermittelte Erkrankung darstellt, muss die genaue Bedeutung für Th17-Zellen in der Pathogenese noch eruiert werden. Inhibition von Th17-Zellen durch Il-25 führte in NOD-Mäusen zum klinischen Schutz vor T1D [70], jedoch zeigte Il-17-Silencing alleine keinen Effekt auf den Fortschritt der Erkrankung in NOD-Mäusen [75]. Des Weiteren konnte erst durch Konversion zu IFN- γ ⁺Th17-Zellen Diabetes in lymphopenen Mäusen ausgelöst werden [76, 77]. Aus diesem Grund ist auch die IFN- γ -Produktion von Th17-Zellen von Bedeutung. In den Polarisierungsversuchen für Th17-Zellen war die IFN- γ -Produktion sehr gering und zeigte keine Unterschiede zwischen WT- und Knockdown-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Da für die Versuche jedoch typische Zytokine für eine Polarisierung hin zu Il-17⁺Th17-Zellen genutzt wurden, ist eine spätere Konversion zu IFN- γ ⁺Th17-Zellen bzw. eine direkte Polarisierung zu IFN- γ ⁺-Th17-Zellen in NOD-Mäusen nicht auszuschließen und sollte daher zukünftig in *in-vivo*-Versuchen analysiert werden.

Die Ergebnisse der Differenzierungsversuche weisen trotz kleiner Gruppen, männlichem Geschlechts und niedriger Doxycyclin-Gabe in Zusammenschau mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen darauf hin, dass der *ptpn22*-KD keinen Effekt auf die Eigenschaften von T-Zellen bezüglich der Differenzierung zu Th1- oder Th17-Zellen hat. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass unklar ist, ob die Bedingungen in den *in-vitro*-Versuchen die Verhältnisse *in vivo* im Pankreas bzw. pLNs der NOD-Mäuse widerspiegeln. Deshalb sollten sich weiterführende Versuche mit dem Zytokinmilieu im Pankreas und den pLNs sowie dem Vergleich der Pathogenität von

Teff-Zellen und der Suppressivität von Treg-Zellen im Pankreas und pLNs zur Milz auseinandersetzen. Ebenfalls sollten zur Verifizierung der Ergebnisse die Versuche mit unterschiedlichen aCD3- und aCD28-Konditionen wiederholt werden, um mögliche Unterschiede in der Differenzierung bei niedriger TCR-Aktivierung darzulegen [173]. Des Weiteren sollten Versuche ebenfalls an weiblichen Tieren durchgeführt werden, um mögliche Einflüsse des Geschlechts ausschließen zu können.

4.2 Suppressivität von Treg-Zellen

Neben der Aktivität der autoreaktiven Teff-Zellen stellt eine eingeschränkte periphere Immuntoleranz durch Treg-Zellen einen weiteren Faktor in der Pathogenese von T1D dar [174]. Da bei Diagnose des T1D die regulatorischen Vorgänge im Thymus bereits abgeschlossen sind, stellt die periphere Toleranz durch regulatorische T-Zellen - auch im Hinblick auf spätere Therapiemöglichkeiten - eine besondere Instanz dar.

Um die Suppressivität von Treg-Zellen aus P2-Mäusen mit WT-Mäusen zu analysieren wurde ein *in-vitro*-Experiment gewählt. Dies hatte den Vorteil besserer Steuerbarkeit der Einflussfaktoren auf die Suppressivität, jedoch zu Kosten der Wiedergabe der tatsächlichen Umgebungsverhältnisse in der NOD-Maus. Der Suppression Assay mit WT-Treg- und WT-Teff-Zellen ergab stark erhöhte Proliferationen im Vergleich zu den P2-Teff-Zellen. In einem Vorläuferexperiment (Daten nicht gezeigt) mit WT-Treg- und WT-Teff-Zellen war eine solch starke Proliferation nicht nachweisbar. Dies ließe Anlass zur Überlegung, dass das Assay an sich fehlerhaft sein könnte und signifikante Unterschiede im Versuch mit Teff-Zellen hierauf zurückzuführen sein. Dies ist ebenfalls im Einklang mit Ergebnissen aus verschiedenen anderen Studien. So konnte in *in-vitro*-Mausversuchen gezeigt werden, dass *ptpn22*-Silencing in Treg-Zellen von B6- sowie NOD-Mäusen keinen Einfluss auf deren Suppressivität bezüglich der Teff-Zellproliferation hatte [135, 136, 140].

Auch für gesunde menschliche Träger der Lyp-620W-Variante konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass Treg-Zellen keine veränderte Wirkung auf die Proliferation von naiven T-Zellen hatten [157]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in NOD-Mäusen mit Überexpression von PTPN22. Dabei konnten im *in-vitro*-Suppression-Assay keine Unterschiede in der Proliferation von Teff-Zellen nachgewiesen werden [136]. Th1-

Zellen hingegen, unabhängig ob von WT- oder P2-Mäusen, zeigten eine verminderte Proliferation unter Inkubation mit P2-Treg-Zellen. Wie bereits für die Versuche mit Teff-Zellen liegen auch hier für Versuche mit WT-Zellen deutlich starke Anstiege bereits bei ausgeglichenen Zellkonzentrationen zwischen Th1-Zellen und Treg-Zellen vor. Da wiederum nur ein Assay pro Versuch durchgeführt wurde, ist fraglich, ob dieser Befund auf eine starke Proliferation von Th1-Zellen zurückzuführen ist, welche im Vergleich zu Versuchen mit Teff-Zellen aufgrund der unterschiedlichen Zellzusammensetzung nicht detektiert werden kann oder auf eine fehlerhafte Durchführung des Versuchs. Zudem wurden die Suppression Assays, wie die Differenzierungsversuche, mit einer festgelegten aCD3-Konzentration und somit definitiven TCR-Aktivierung durchgeführt. Hierbei könnten Unterschiede in der Suppressivität bzw. Proliferation, die nur bei höheren oder niedrigeren aCD3/aCD28-Konzentrationen auftreten, übersehen werden. In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass der Typ an Responder-Zellen in einem Suppression Assay den größten Einfluss auf das Ergebnis hat [175], respektive naive T-Zellen zu Teff-Zellen. Das Ergebnis wurde auf eine veränderte Il-2-Produktion der Zelltypen und hiermit verbundene Aktivierung der Treg-Zellen zurückgeführt. Dies könnte einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse aus Suppression Assays von Teff- und neu polarisierten Th1-Zellen darstellen.

In den durchgeführten Versuchen ergaben sich keine Unterschiede zwischen WT- und P2-Treg-Zellen bezüglich ihrer Suppressivität auf die IFN- γ -Produktion von Th1-Zellen oder Teff-Zellen (Daten nicht gezeigt). Vang et al. konnten jedoch in Versuchen mit gesunden Trägern der Lyp-620W Variante *in vitro* nachweisen, dass Tconv-Zellen unter Inkubation mit Treg-Zellen mehr IFN- γ produzierten, als Träger des Nicht-Risiko-Allels von *ptpn22*. Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche an antigenspezifischen CD8⁺-Zellen, die *in vitro* weniger IFN- γ produzierten, wenn sie mit *ptpn22*-KO-Treg-Zellen inkubiert wurden [138]. Eine Auswirkung von PTPN22 bezüglich der suppressiven Eigenschaften von Treg-Zellen auf die IFN- γ -Produktion von Teff-Zellen ist somit nicht auszuschließen. Daher ist nicht abschließend geklärt, ob der Schutz vor T1D in P2-Mäusen auf eine veränderte Suppressivität der Treg-Zellen zurückzuführen ist oder ob andere Mechanismen hierfür verantwortlich sind.

Brownlie et al. fanden in *in-vivo*-Versuchen heraus, dass Rag1-KO-Mäuse zwei Wochen nach Injektion mit WT-naiven-T-Zellen geringere Konzentrationen an Teff-Zellen in den Lymphknoten aufwiesen, wenn die naiven T-Zellen mit *ptpn22*-KO-Treg-Zellen anstatt mit WT-Treg-Zellen injiziert wurden [139]. Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Zellzahl von WT- zu *ptpn22*-KO-Treg-Zellen in den Lymphknoten. Im Gegensatz hierzu wiesen P2-Mäuse sowie *ptpn22*-KO-B6-Mäuse erhöhte Treg-Zellen auf im Vergleich zu WT-NOD-Mäusen auf [135, 140]. In P2-Mäusen war diese Veränderung auf eine verminderte Apoptose von Treg-Zellen zurückzuführen [163].

Neben einer veränderten Verteilung und Apoptoserate weisen *ptpn22*-KO-Treg-Zellen außerdem erhöhte Il-10-Werte sowie eine höhere Integrin-Exprimierung auf [139]. Ein Treg-vermittelter Schutz von P2-Mäusen könnte somit auch durch ein verlängertes Überleben sowie veränderte Lokalisierung dieses Zelltyps zurückzuführen sein. Wie bereits in der Einleitung angeführt, könnten zudem Unterschiede in der Suszeptibilität von Teff-Zellen gegenüber suppressiven Signalen der Treg-Zellen vorliegen [176] oder Defekte anderer Zelltypen wie APCs [177] über die eine veränderte Protektivität vermittelt werden könnte.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen weisen die erhobenen Befunde darauf hin, dass der Verlust von PTPN22 nicht zu einer verstärkten Suppression der T-Zellproliferation führt. Besondere Beachtung sollte jedoch den Ergebnissen aus den Untersuchungen mit Th1-Zellen sowie Ergebnissen bezüglich einer verminderten IFN- γ -Produktion geschenkt werden aufgrund der pathogenetischen Bedeutung für T1D.

Darüber hinaus zeigte sich, dass der Verlust von PTPN22 neben einem verlängerten Überleben zu einem erhöhten Anteil an Treg-Zellen führen kann sowie zu veränderten adhäsiven Eigenschaften und einer alterierten Zytokinproduktion [139]. Zusätzlich kommt Treg-Zellen eine besondere Bedeutung für die Gewebeinfiltration über CXCR3-Expression [107] sowie Zytokindifferenzierung zu, die für die Pathogenese von T1D wichtige Schritte darstellen [85].

Die genaue Wirkung von *ptpn22* bzw. des Risikoallels auf die Immunhomöostase in T1D bleibt daher weiterhin nicht vollständig geklärt, wobei eine Auswirkung auf die IFN- γ -Produktion von Teff-Zellen einen möglichen Faktor darstellt.

Wie bereits beschrieben, hat PTPN22 als negativer Regulator der TCR-Signalkaskade einen großen Einfluss auf die Aktivierung und Regulierung von T-Zellen. Wird PTPN22 nicht exprimiert, kann dies bei Antigenen, die sonst ein ungenügendes Signal erzeugen, zur Aktivierung von Teff-Zellen führen und sogar zur Bildung von Gedächtnis-T-Zellen [173]. Für die Induktion von regulatorischen T-Zellen ist ein hohes TCR-Signal notwendig. In *ptpn22*-KD-Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits eine niedrigere TCR-Aktivierung zur Differenzierung von naiven T-Zellen hin zu Treg-Zellen ausreichend war [162].

Mit den nachgewiesenen Veränderungen des Treg-Zellkompartiments und neuen Ansätze zur Induktion von Treg-Zellen [178] stellt dieser Zelltyp daher einen potentiellen Ansatz zur Therapie von Autoimmunkrankheiten und T1D dar. Jedoch müssen zusätzlich die Suszeptibilität von Teff-Zellen, die Funktion anderer Zellen und das Zytokinmilieu beachtet werden.

4.3 PTPN22 und Insulitis in der NOD-Maus

Insulitis bezeichnet die entzündlichen Vorgänge innerhalb der Langerhans-Zellen, die schlussendlich zur β -Zellzerstörung führen. Hierbei durchläuft der Prozess typische Stadien, beginnend mit der Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen im pankreatischen Lymphknoten über die nicht-destruktive Einwanderung von Immunzellen in das Pankreas bis zum Zusammenbruch des Gleichgewichts zwischen regulatorischen und Teff-Zellen in den Langerhans-Inseln, die anschließend zur Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen führt.

Versuche wurden an drei Monate alten Mäusen durchgeführt, die Doxycyclin ab dem zweiten Lebensmonat erhielten. Somit befanden sich die Mäuse zum Zeitpunkt der Opferung am Übergang von nicht-destruktiver zu destruktiver Insulitis [58]. Zudem fiel die Stilllegung von *ptpn22* in den Zeitraum der Aktivierung und Proliferation der pathogenen Teff-Zellen. Dies ist insofern von Bedeutung, da hierdurch die Ergebnisse der *in-vitro*-Differenzierung und Suppression Assays *in vivo* überprüft werden können.

Zudem stellt dieser Zeitraum ein Intervall für eine potentielle Diagnostik und Therapie dar, da pathologisch ein Korrelat im Pankreas nachzuweisen ist, jedoch noch kein Verlust von β -Zellen vorliegt.

Die untersuchten Organe umfassten das Pankreas, als Ort der β -Zellzerstörung, die pankreatischen Lymphknoten, also den Ort der Aktivierung und Differenzierung pathogener T-Zellen, und die Milz als Bestandteil des allgemeinen Immunkreislaufs und Ort der höchsten Dichte differenzierter Teff-Gedächtniszellen. Neben $CD4^+$ -T-Zellen und $CD8^+$ -Zellen mit ihren Untergruppen an $IFN-\gamma^+$ - und $IL-17^+$ - produzierenden Zellen als wichtigen Vermittlern der Immunantwort sowie Treg-Zellen war ebenfalls die Verteilung von B-Zellen als Produzenten von Autoantikörpern sowie mögliche Regulatoren der Insulinitis von Interesse. Da gezeigt wurde, dass CXCR3 einer der grundlegenden Rezeptoren zur Migration von T-Zellen, vorrangig von Th1-Zellen, in das Pankreas darstellt, wurde die CXCR3-Expression genutzt um die Migrationseigenschaften von $CD4^+$ -Zellen in das Pankreas zu untersuchen.

Die Experimente wurden an WT- und P2-Mäusen zu je sieben Tieren durchgeführt. Dies führt aufgrund der kleinen Stichprobe zu einer Verminderung der Teststärke, so dass die Ergebnisse des Versuchs unter Vorbehalt interpretiert werden müssen. Des Weiteren wurden die Versuche an weiblichen Tieren durchgeführt im Gegensatz zu meist männlichen Tieren in den vorherigen Versuchen, was für die Vergleichbarkeit des *in-vivo*-Versuchs zu den vorherigen *in-vitro*-Versuchen bei möglichem Einfluss des Geschlechts auf das T1D-Risiko und dessen Krankheitsverlauf bedacht werden muss. Leider ließ sich aus technischen Gründen keine Flusszytometrie für $IFN-\gamma^+$ - $CD8^+$ -Zellen im Pankreas durchführen.

Wie beschrieben, stellt das Pankreas den Schauplatz der β -Zellzerstörung dar. Dabei ist T1D eine T-Zell-vermittelte Erkrankung, in der $CD8^+$ -Zellen direkt zytotoxisch auf β -Zellen wirken und $CD4^+$ -Zellen mittels Zytokinen eine Steuerfunktion der Immunreaktion einnehmen. Aus diesem Grund kann bereits die verminderte Anzahl sowohl von $CD8^+$ - als auch $CD4^+$ -Zellen in Pankreata von P2-Mäusen als mögliches Korrelat für einen Schutz vor der Erkrankung aufgefasst werden. Unterstützend für diese These ist ebenfalls die verminderte Anzahl an $IFN-\gamma^+$ $CD4^+$ -Zellen. Da WT- und P2-Mäuse keine Unterschiede in den $IL-17^+$ $CD4^+$ -Zellanteilen aufwiesen und diese sehr

niedrig waren, könnte vermutet werden, dass Th-17-Zellen keine bedeutende Rolle in der Pathogenese von T1D einnehmen. Jedoch ist aufgrund der durchgeführten Analysen nicht klar zu unterscheiden, ob die IFN- γ -produzierenden Zellen Th1- oder Th17-Zellen darstellen. Ein Vorliegen von IFN- γ^+ Th17-Zellen ist somit nicht ausgeschlossen. Die verminderte Anzahl an Teff-Zellen in P2-Pankreata könnte ein Hinweis auf eine gestörte Migration der Zellen in die Langerhans-Inseln sein. CXCR3 als ein wichtiger Regulator der Zellmigration, v.a. für Th1-Zellen, zeigt im Mittel niedrigere Expression in P2-CD4⁺-Zellen des Pankreas, war jedoch bei einem Ausreißer nicht signifikant. Somit ist nicht klar abzugrenzen, ob eine eingeschränkte CXCR3-vermittelte Migration der Grund für die verminderte Anzahl an CD4⁺-Zellen in P2-Pankreata ist. Ein weiterer Grund könnte eine gestörte Proliferation oder ein vermindertes Überleben dieser Zellen im Pankreas sein durch ein verändertes inflammatorisches Milieu oder eine CXCR3-unabhängige Einschränkung der T-Zellmigration.

Neben den Teff-Zellen trägt auch eine gestörte Immuntoleranz zur Krankheitsprogression von T1D bei. Zwar war der Anteil an Treg-Zellen in Pankreata von P2-Mäusen nicht verändert, jedoch könnte das hin zu Treg-Zellen verschobene Verhältnis von Treg-Zellen zu CD8⁺-Zellen und IFN- γ^+ CD4⁺-Zellen ein Hinweis auf einen verstärkten Schutz von P2-Mäusen darstellen und eine Erklärung für das verspätete Auftreten von T1D in diesen Mäusen sein.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben B-Zellen im Infiltrat der Langerhans-Inseln anscheinend keinen direkten zytotoxischen Effekt auf β -Zellen. Die im Infiltrat vorkommenden CD20⁺-B-Zellen könnten jedoch unterstützend, z.B. über die Aufrechterhaltung der Aktivität von CD8⁺-Zellen, zum Krankheitsprozess beitragen [179]. Da im Pankreas von WT- und P2-Mäusen kein Unterschied im Anteil der B-Zellen vorlag, ist jedoch fraglich ob sich die *ptpn22*-Stilllegung auf das B-Zellkompartiment im Pankreas auswirkt.

Zusammenfassend könnte der klinische Schutz von P2-Mäusen zum einen auf eine verminderte Anzahl an pathogenen Teff-Zellen sowie eine eingeschränkte Produktion pathogener Zytokine, wie IFN- γ , durch CD4⁺-Zellen im Pankreas zurück zu führen sein und zum anderen auf ein verändertes Treg- zu Teff-Zellverhältnis, wodurch die

Immuntoleranz im Pankreas länger aufrecht erhalten bliebe als in WT-Mäusen. Dabei ist nicht schlussendlich geklärt, ob die verminderte Anzahl an Teff-Zellen von einer veränderten Reifung bzw. Migration oder vermindertem Überleben und Proliferation im Pankreas herzuleiten ist.

Des Weiteren ist zu klären, welche CD4⁺-Zellen für die IFN- γ -Produktion verantwortlich sind und ob der Abfall der IFN- γ -Produktion z.B. mit einer niedrigeren Anzahl an IFN- γ -produzierenden Th17-Zellen erklärt werden könnte. Daher sollten zur weiteren Differenzierung der Ergebnisse Transkriptionsfaktoren für Th1- und Th17-Zellen im Pankreas bestimmt werden. Ebenfalls kann durch die Flusszytometrie keine Aussage über die reale Zellverteilung in den Langerhans-Inseln und das Ausmaß an β -Zellzerstörung getroffen werden. Daher sollten zur Bestätigung eines klinischen Schutzes zusätzlich histologische Färbungen der Langerhans-Inseln durchgeführt werden.

In pankreatischen Lymphknoten werden naive T-Zellen geprimt und differenzieren sich in Th-Zellen. Ebenso reifen naive B-Zellen unter Antigenpräsentation und Interaktion mit Th-Zellen zu Plasmazellen heran [99]. Der pLN nimmt daher für die Aktivierung von diabetogenen Immunzellen und deren Reaktivität eine zentrale Rolle ein [58].

Wie im Pankreas zeigen sich ebenso in pLNs von P2-Mäusen deutlich niedrigere CD8⁺-Zellanteile. Dies könnte für ein vermindertes Priming von Teff-Zellen sprechen und somit die verminderte Anzahl an Teff-Zellen im Pankreas erklären. Im Gegensatz zu den CD8⁺-Zellen sind die Anteile an CD4⁺-Zellen im pLN durch *ptpn22*-Knockdown jedoch signifikant erhöht gewesen, was auf eine stärkere Aktivierung und Proliferation von CD4⁺-Zellen hinweisen könnte. Dies steht jedoch im Gegensatz zu der verminderten Anzahl an CD4⁺-Zellen im Pankreas. Für diese Diskrepanz gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Wie im Absatz über Pankreata beschrieben, könnte eine gestörte Migration von Teff-Zellen in das Pankreas Grund hierfür sein. Jedoch besteht keine verminderte CXCR3-Expression von CD4⁺-Zellen in pLNs von P2-Mäusen. Zudem ist die Anzahl an CD8⁺-Zellen vermindert und nicht erhöht. Somit könnte der erhöhte Anteil an CD4⁺-Zellen im pLN darauf hinweisen, dass keine gestörte Migration vorliegt, sondern ein anderer Mechanismus zum spezifischen Anstieg der CD4⁺-Zellen führt. Obwohl der Anteil an CD4⁺-Zellen gesamt erhöht ist, sind IFN- γ -

sowie Il-17-Produktion in diesen Zellen nicht verändert, bzw. sind bei einem Ausreißer nicht signifikant vermindert. Somit kann festgestellt werden, dass das CD4⁺-Zellkompartiment in pLNs von P2-Mäusen nicht vermehrt aus Th1- oder Th17-Zellen besteht. Dies könnte möglicherweise auf eine erhöhte Ansammlung an naiven T-Zellen hinweisen. Hierfür würde ebenfalls der verminderte Anteil an B-Zellen in pLNs sprechen. Dieser könnte entweder auf eine verminderte Anzahl an antigenpräsentierenden B-Zellen hinweisen, die zu einer verminderten Aktivierung von CD4⁺-Zellen führen könnten oder auf eine verminderte T-Zell-abhängige B-Zellproliferation, da hierfür im pLN keine geprimten Th-Zellen zur Verfügung stünden. Im Gegensatz zu der Gesamtzahl an CD4⁺-Zellen ist der Anteil an Treg-Zellen in P2-Mäusen erhöht. Auch hier führt ein Ausreißerwert zu einem nicht signifikanten Unterschied der Gruppen. Dabei konnten andere Forschungsgruppen in pLNs von P2-Mäusen signifikant erhöhte Anteile von Treg-Zellen nachweisen [163]. Daher wäre ebenfalls denkbar, dass der erhöhte Anteil an CD4⁺-Zellen auf eine vermehrte Bildung von Treg-Zellen zurückzuführen ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass Treg-Zellen nicht primär über eine eingeschränkte Proliferation auf T-Zellen wirken, sondern v.a. über eine verminderte IFN- γ -Produktion zur fehlerhaften Differenzierung von Th-Zellen und niedrigere CXCR-3-Expression dieser Zellen und somit die Migration ins Zielgewebe stören [107]. Der *ptpn22*-Knockdown könnte daher über ein verstärktes TCR-Signal eine verstärkte Treg-Differenzierung und gestörte Teff-Differenzierung und Migration bedingen. Um diese These stützend zu untermauern, sollte die CD62L-Expression auf CD4⁺-Zellen bestimmt werden um zu überprüfen, ob diese Zellen Effektor- oder naive T-Zellen darstellen.

Unabhängig von diesen Befunden konnte gezeigt werden, dass PTPN22 nicht nur zellspezifisch exprimiert wird, sondern auch organ- und zeitspezifisch [180]. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die PTPN22-Expression in pLNs von NOD-Mäusen in Abhängigkeit von MHC-vermittelter Antigenpräsentation in Woche 8 und Woche 16 herunterreguliert wurde. Dies weist auf eine bedeutende Rolle für PTPN22 in pLNs für die Pathogenese von T1D, zumindest im NOD-Mausmodell, hin und könnte über eine veränderte TCR-Signaltransduktion zu einem veränderten Gleichgewicht zwischen Treg- und Teff-Zellen führen. Da die PTPN22-Expression zeitabhängig ist, sollten die durchgeführten Versuche ebenfalls um die 8. und 12. Lebenswoche von NOD-Mäusen

wiederholt werden, um die Bedeutung dieser Zeitpunkte in der Pathogenese von T1D und ihre Auswirkung auf Immunzellen besser verstehen zu können.

Durch Splenektomie an NOD-Mäusen konnte bewiesen werden, dass die Milz in diesem T1D-Modell keinen Einfluss auf die Pathogenese von T1D hat [58]. Jedoch stellt die Milz ein Reservoir für T- und B-Gedächtniszellen dar, auch aus dem Grund, weil nach Krankheitsbeginn die Zirkulation von Teff-Gedächtniszellen im Blut beinahe vollständig zum Erliegen kommt [114]. Es zeigte sich für CD8⁺- sowie CD4⁺-Zellen verminderte Zellanteile in der Milz von P2-Mäusen. Dies widerspricht Untersuchungen von Zheng und Kissler, die unter ähnlichen Bedingungen keinen Unterschied für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in der Milz von P2-Mäusen feststellen konnten [135]. Untersuchungen an *ptpn22*-KO-B6-Mäusen wiesen ein vergrößertes Kompartiment an T-Gedächtniszellen nach [131]. Daher ist fraglich, wie dieser Befund interpretiert werden sollte. Ebenfalls ist unklar, was zur Verminderung der Il-17-produzierenden CD4⁺-Zellen und der Erhöhung IFN- γ -produzierenden CD8⁺-Zellen führte.

In der Milz von P2-Mäusen zeigten sich des Weiteren ein erhöhter Anteil an Treg-Zellen. In Zusammenschau mit den Überlegungen zur Treg-Entwicklung in pLNs könnte dies auf eine erhöhte Proliferation und Bildung langlebiger Treg-Zellen hinweisen, was wiederum zur veränderten Differenzierung von Teff-Zellen und einer verminderten Bildung von Teff-Gedächtniszellen führen und somit die Zellverteilung in der Milz erklären könnte. Einen erhöhten Anteil an Treg-Zellen in der Milz von P2-Mäusen konnte unabhängig in einer weiteren Studie bestätigt werden [135].

Darüber hinaus war der B-Zellanteil in Milzen von P2-Mäusen ebenfalls erhöht. Da in pLNs der Anteil an B-Zellen vermindert war, ist anzunehmen, dass die proliferierenden B-Zellen in der Milz nicht aus den pankreatischen Lymphknoten stammten, sondern aus einer anderen Population, die direkt in die Milz poolt und hier geprimt wird [181]. Jedoch konnten Zheng und Kissler auch für B-Zellen keinen Unterschied in der Milz von P2-Mäusen nachweisen [135].

Daher sind gerade in Bezug auf die Ergebnisse von Zheng und Kissler die veränderten Zellanteile in der Milz nicht abschließend geklärt. Dabei ist fraglich ob Zheng und Kissler auch männliche Tiere in ihren Studien benutzt haben und somit unterschiedliche Ergebnisse in der Milz geschlechterspezifisch auftraten. Trotzdem sollte zur

Überprüfung der unterschiedlichen Ergebnisse die Versuche wiederholt werden und das T- und B-Zellkompartiment auf das Vorliegen von Gedächtniszellen untersucht werden.

In-vivo-Versuche an P2-Mäusen zeigen, das *PTPN22*-Knockdown zu starken Veränderungen bezüglich der Zellverteilung von Immunzellen in der NOD-Maus führt. Dabei könnte das verspätete Einsetzen des absoluten Insulinmangels auf eine verminderte Einwanderung von Teff-Zellen in die Langerhans-Inseln und ein Überwiegen an Treg-Zellen im Pankreas zurückzuführen sein. Dabei sollten diese Ergebnisse jedoch durch histologische Untersuchungen überprüft werden. Ebenso sollten die Abnahme der IFN- γ -produzierenden T-Zellen gezielt untersucht werden, um z.B. eine verminderte Umwandlung von Th17-Zellen zu IFN- γ -produzierenden Zellen feststellen zu können. Der Effekt auf das Pankreasinfiltrat könnte durch veränderte Differenzierung von T-Zellen im pLN ausgelöst werden, wobei vermehrte Treg-Zellen eine Auswirkung v.a. auf die Differenzierung von naiven T-Zellen und das Migrationsverhalten von Teff-Zellen haben könnten.

4.4 Konklusion

PTPN22 nimmt eine komplexe Rolle im Immunsystem ein. Ihr vielfältiges Vorkommen sowie ihre vom Zelltyp sowie Aktivierungszustand der Zelle abhängige Expression führt zu zeitlichen und örtlichen Schwankungen der Enzymmenge, wie Untersuchungen an pLNs von NOD-Mäusen zeigen. Hinzu kommt, dass die Phosphatase in verschiedene Rezeptor-Signalkaskaden eingreift, initiiert z.B. durch TCR, BCR und TLR, und nicht abschließend geklärt ist, wie sich die strukturellen Veränderungen der Risikovariante *ptpn22*W* in Bezug auf die Bindung zu anderen Enzymen, wie Csk - auch in Abhängigkeit von deren Konzentrationen - auswirken.

Es ergibt sich somit das Bild eines Steuerenzym, das im ohnehin komplexen Immunsystem weitreichende Auswirkungen auf Aktivierung, Differenzierung, Funktion und Überleben von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems hat. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von *ptpn22* in Pankreata von P2-Mäusen zu einem verminderten Vorkommen von Teff-Zellen und einem hin zu Treg-

Zellen verschobenen Verhältnis von Treg- zu Teff-Zellen führt. Dies könnte das spätere Einsetzen eines absoluten Insulinmangels in diesen Mäusen durch eine verlängerte Aufrechterhaltung der Immunhomöostase in den Langerhans-Inseln erklären. Dabei führte der Knockdown von *ptpn22* zu keinem bzw. nur einem geringen Effekt auf die *in-vitro*-Suppressivität von Treg-Zellen, wobei jedoch zusätzliche Regulationsmechanismen über die Treg-Zellen *in vivo* wirken nicht ausgeschlossen werden können. Die Befunde in den Pankreata könnten durch eine veränderte oder gestörte Differenzierung von Th-Zellen in pLNs ausgelöst werden, wobei eine Einwirkung von Treg-Zellen auf diesen Prozess möglich erscheint und weitergehend untersucht werden sollte. *ptpn22*-Stilllegung zeigte keinen Einfluss auf die *in-vitro*-Differenzierung von T-Zellen in Th1- oder Th17-Zellen. Jedoch vernachlässigen *in-vitro*-Versuche die genauen Gegebenheiten im Körper des Menschen bzw. der Mäuse. Dies ist von besonderer Bedeutung, da viele Faktoren, wie Zellplastizität und die unmittelbare Umgebung, mit direkten Zellsignalen sowie Zytokinen starken Einfluss auf β -Zellen sowie T-Zellen ausüben.

Zusätzlich wird dem angeborenen Immunsystem ein immer größerer Einfluss auf die Pathogenese von T1D zugeschrieben. Aufgrund der vielseitigen Effekte von *ptpn22* und des Risikoallels R620W auf das Immunsystem sollte daher auch der Einfluss auf das angeborene Immunsystem durch weitere Studien untersucht werden.

Neben der Bedeutung des Immunsystems für T1D wurden ebenfalls Einflüsse der extrazellulären Matrix der Langerhans-Inseln auf die Krankheitsentstehung identifiziert [182, 183]. Daher ist eine Determinierung der tatsächlichen Einflussfaktoren auf β -Zellen und Immunzellen - gerade aufgrund der umfangreichen Effekte von PTPN22 *in vitro* - von großer Bedeutung, um den pathogenetischen Beitrag des Risikoallels für T1D genau verstehen zu können. *In-vivo*-Versuche helfen diese veränderten Eigenschaften in den zeitlichen und örtlichen Kontext der Erkrankungen mit den tatsächlich vorherrschenden Bedingungen im Körper zu setzen und können so zeigen, welchen genetischen und zytokinvermittelten „Fußabdruck“ die Erkrankungen besitzt. Dies kann dazu beitragen relevante Zeitpunkte in der Krankheitsentstehung zu identifizieren und so eine gezielte Therapie einzuleiten. Hilfreich hierfür könnte z.B. die Erstellung eines „Zytokinoms“ sein, welches die zeitlich und örtlich spezifische Steuerung von Immunzellen während der Pathogenese abbilden könnte.

Experimentelle Grundlagenforschung soll schlussendlich dazu beitragen, die Behandlung von Erkrankten zu verbessern. Derzeit wird jedoch zur örtlich genauen Bestimmung von Zytokinen und Zellverteilungen invasive Diagnostik, wie Biopsien, benötigt, die wiederum mit deutlichen Risiken für den Patienten eingehen. Bei einer Erkrankung wie T1D, bei der die Diagnose vor allem in jungen Jahren gestellt wird und die heutigen Therapiemöglichkeiten ein Überleben mit geringer Morbidität und Mortalität bietet, stellt sich die Frage der Rechtfertigung für einen derart invasiven Eingriff. Daher könnten möglicherweise neuartige diagnostische Methoden in der Bildgebung, z.B. aus der Immuntherapie von Tumoren, einen Lösungsweg darstellen [184-186]. Mit neuen technischen Möglichkeiten und einem tieferen und weitreichenderem Verständnis der pathogenetischen Zusammenhänge von PTPN22 und T1D kann dies möglicherweise zur Entwicklung von Screeningverfahren zur Identifikation von Risikopatienten führen bzw. zu einer gezielteren und verbesserten Behandlung vor Einsetzen des absoluten Insulinmangels und so zu einem verzögertem Krankheitseintritt oder Heilung der Erkrankung.

5. Zusammenfassung

Typ-1-Diabetes (T1D) ist charakterisiert durch eine Hyperglykämie aufgrund eines absoluten Insulinmangels, bedingt durch eine immunvermittelte Zerstörung der Insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas [1].

In Deutschland leben ca. 200.000 Menschen mit T1D, wobei mehrere Studien eine weltweite Inzidenzsteigerung von 3% in den letzten Jahren nachgewiesen haben [2, 17-19]. Trotz gesteigerter Lebenserwartung und an den Lebensstil des Patienten angepasster Insulinsubstitution ist T1D weiterhin mit Spätfolgen wie Mikro- und Makroangiopathien vergesellschaftet, die zu einer erhöhten Morbidität sowie Mortalität führen [28,29].

Die Ätiologie von T1D ist nicht vollständig geklärt. Heutzutage wird jedoch von einem Zusammenwirken genetischer Disposition und Umweltfaktoren ausgegangen, welches zur Autoimmunreaktion gegen β -Zellen führt. Mittels GWAS konnten für T1D mehrere neue Risikoallele identifiziert werden, u.a. auch für die Protein-Thyrosin-Phosphatase Nicht-Rezeptortyp 22 (PTPN22).

PTPN22 wird in allen hämatopoetischen Zellen exprimiert und greift u.a. in T-Zellen in die Steuerung des proximalen Signalwegs des T-Zell-Rezeptors ein. Zheng und Kissler konnten zeigen, dass eine *ptpn22*-Stilllegung in NOD-Mäusen zu einer signifikant verlangsamten Krankheitsentstehung von T1D führt [135].

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der genaueren Auswirkung der *ptpn22*-Stilllegung auf die Entwicklung, Suppressivität sowie Verteilung von T-Lymphozyten in der NOD-Maus um einen Erklärungsansatz für den klinischen Schutz zu finden.

Da T1D als Th1-zellvermittelte Erkrankung angesehen wird und menschliche Träger der Risikovariante von PTPN22 eine hin zu Th1-Zellen verschobene Differenzierung von CD4-T-Zellen aufwiesen [157], wurden Versuche zur Differenzierung von naiven T-Zellen aus NOD-Mäusen durchgeführt. Hier zeigte sich durch die Ausschaltung von *ptpn22* weder ein intrinsischer noch extrinsischer Effekt auf die Entwicklung von naiven CD4⁺-Zellen in Th1- oder Th17-Zellen.

Individuen, die Träger des Risikoallels sind, zeigen eine verminderte Suppressivität von Treg-Zellen auf die Th1-vermittelte IFN-Produktion [157]. Da Treg-Zellen eine bedeutende Komponente der peripheren Immuntoleranz darstellen, könnte durch eine

verstärkte Unterdrückung von Teff-Zellen ein möglicher Schutz vor T1D gewährleistet werden. In den durchgeführten Suppression Assays zeigten Treg-Zellen aus NOD-Mäusen mit *ptpn22*-Knockdown im Vergleich zu Treg-Zellen aus unbehandelten NOD-Mäusen keine veränderten suppressiven Eigenschaften gegenüber Th1-Zellen sowie Tconv-Zellen.

In NOD-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Überexpression von PTPN22 zu einer veränderten Verteilung von Immunzellen führte [136]. Durch *ptpn22*-Knockdown konnte in der durchgeführten Arbeit eine verminderte Anzahl von CD8⁺- und CD4⁺-Zellen sowie ein erhöhter Quotient an Treg-Zellen im Pankreas der betroffenen Mäuse nachgewiesen werden. Dies könnte einen klinischen Schutz dieser Mäuse im Vergleich zu unbehandelten NOD-Mäusen durch eine veränderte periphere Toleranz erklären. Um die Ursachen für diese veränderte Zellverteilung, wie verändertes Priming bzw. Migration in das Pankreas genauer abzuklären, müssen weitere *in-vivo*-Versuche durchgeführt werden zur Bestimmung der tatsächlich vorliegenden Einflussfaktoren auf die Immunzellen im zeitlichen Kontext der T1D-Pathogenese.

Hierzu könnte die Erstellung eines Zytokinoms bzw. bildgebende Verfahren eine Hilfestellung liefern. Dies könnte schlussendlich dazu beitragen, Individuen mit erhöhtem Risiko für T1D zu screenen, vulnerable Zeitpunkte in der T1D-Pathogenese zu erkennen und so eine rechtzeitige, adäquate Behandlung der betroffenen Personen einzuleiten.

6. Quellenverzeichnis

1. Burn, P., *Type 1 diabetes*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**(3): p. 187-188.
2. International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas, 7th edn*. International Year Book and Statesmen's Who's Who. 2015, Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.
3. Evans, J.M.M., et al., *Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus*. Diabetic Medicine, 2000. **17**(6): p. 478-480.
4. Boyle, J.P., et al., *Estimating Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes in a Population of African Americans with Diabetes Mellitus*. American Journal of Epidemiology, 1999. **149**(1): p. 55-63.
5. Bruno, G., et al., *Incidence of Type 1 and Type 2 Diabetes in Adults Aged 30-49 Years: The population-based registry in the province of Turin, Italy*. Diabetes Care, 2005. **28**(11): p. 2613-2619.
6. Holman, N., B. Young, and R. Gadsby, *Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK*. Diabetic Medicine, 2015. **32**(9): p. 1119-1120.
7. Tamayo, T., et al., *Prävalenz und Inzidenz von Diabetes mellitus in Deutschland*. Deutsches Ärzteblatt International, 2016. **113**(11): p. 117-182.
8. DIAMOND Project Group, *Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999*. Diabetic Medicine, 2006. **23**(8): p. 857-866.
9. EURODIAB ACE Study Group, *Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe*. The Lancet, 2000. **355**(9207): p. 873-876.
10. The Writing Group for the SEARCH for Diabetes in Youth Study Group, *Incidence of Diabetes in Youth in the United States*. JAMA, 2007. **297**(24): p. 2716-2724.
11. Thunander, M., et al., *Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2008. **82**(2): p. 247-255.
12. Ou, H.-T., et al., *Life Expectancy and Lifetime Health Care Expenditures for Type 1 Diabetes: A Nationwide Longitudinal Cohort of Incident Cases Followed for 14 Years*. Value in Health, 2016. **19**(8): p. 976-984.
13. Dahlquist, G.G., L. Nyström, and C.C. Patterson, *Incidence of Type 1 Diabetes in Sweden Among Individuals Aged 0–34 Years, 1983–2007*. Diabetes Care, 2011. **34**(8): p. 1754-1759.
14. Östman, J., et al., *Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983–2002*. Journal of Internal Medicine, 2008. **263**(4): p. 386-394.
15. Green, A., E.A.M. Gale, and C.C. Patterson, *Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE study*. The Lancet, 1992. **339**(8798): p. 905-909.
16. Karvonen, M., et al., *Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data*. Diabetes / Metabolism Reviews, 1997. **13**(4): p. 275-291.
17. Dabelea, D., *The accelerating epidemic of childhood diabetes*. The Lancet, 2009. **373**(9680): p. 1999-2000.

18. Patterson, C., et al., *Diabetes in the young – a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2014. **103**(2): p. 161-175.
19. Maahs, D.M., et al., *Epidemiology of Type 1 Diabetes*. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 2010. **39**(3): p. 481-497.
20. Harjutsalo, V., L. Sjöberg, and J. Tuomilehto, *Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study*. *The Lancet*, 2008. **371**(9626): p. 1777-1782.
21. Mehers, K.L. and K.M. Gillespie, *The genetic basis for type 1 diabetes*. *British Medical Bulletin*, 2008. **88**(1): p. 115-129.
22. Baidal, D.A., et al., *Bioengineering of an Intraabdominal Endocrine Pancreas*. *New England Journal of Medicine*, 2017. **376**(19): p. 1887-1889.
23. Pagliuca, F.W., et al., *Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro*. *Cell*, 2014. **159**(2): p. 428-439.
24. Walter, M., et al., *No Effect of the Altered Peptide Ligand NBI-6024 on β -Cell Residual Function and Insulin Needs in New-Onset Type 1 Diabetes*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(11): p. 2036-2040.
25. Wherrett, D.K., et al., *Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial*. *The Lancet*, 2011. **378**(9788): p. 319-327.
26. Van Belle, T.L., K.T. Coppieters, and M.G. Von Herrath, *Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies*. *Physiological Reviews*, 2011. **91**(1): p. 79-118.
27. Wise, J., *Type 1 diabetes is still linked to lower life expectancy*. *BMJ*, 2016: p. i1988.
28. Orchard, T.J., et al., *Type 1 Diabetes and Coronary Artery Disease*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(11): p. 2528-2538.
29. Maser, R.E., et al., *Cardiovascular disease and arterial calcification in insulin-dependent diabetes mellitus: interrelations and risk factor profiles. Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study-V*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1991. **11**(4): p. 958-965.
30. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. *The Lancet*, 2014. **383**(9911): p. 69-82.
31. Yaffe, K., *Association Between Hypoglycemia and Dementia in a Biracial Cohort of Older Adults With Diabetes Mellitus*. *JAMA Internal Medicine*, 2013. **173**(14): p. 1300.
32. Concannon, P., S.S. Rich, and G.T. Nepom, *Genetics of Type 1A Diabetes*. *New England Journal of Medicine*, 2009. **360**(16): p. 1646-1654.
33. Noble, J.A., et al., *HLA Class I and Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes: Results From the Type 1 Diabetes Genetics Consortium*. *Diabetes*, 2010. **59**(11): p. 2972-2979.
34. Erlich, H., et al., *HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk: Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families*. *Diabetes*, 2008. **57**(4): p. 1084-1092.
35. Achenbach, P., et al., *Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes*. *Journal of Clinical Investigation*, 2004. **114**(4): p. 589-597.
36. Sabbah, E., *Glutamic acid decarboxylase antibodies in relation to other autoantibodies and genetic risk markers in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes*.

- Childhood Diabetes in Finland Study Group*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1996. **81**(7): p. 2455-2459.
37. Pociot, F., et al., *Genetics of Type 1 Diabetes: What's Next?* Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1561-1571.
 38. Pugliese, A., et al., *The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes*. Nature Genetics, 1997. **15**(3): p. 293-297.
 39. Vafiadis, P., et al., *Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus*. Nature Genetics, 1997. **15**(3): p. 289-292.
 40. Lowe, C.E., et al., *Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes*. Nature Genetics, 2007. **39**(9): p. 1074-1082.
 41. Hermann, R., et al., *Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with Type 1 diabetes—indication of an increased environmental pressure?* Diabetologia, 2003. **46**(3): p. 420-425.
 42. Gillespie, K.M., et al., *The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes*. The Lancet, 2004. **364**(9446): p. 1699-1700.
 43. Knip, M. and O. Simell, *Environmental Triggers of Type 1 Diabetes*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(7): p. a007690-a007690.
 44. de Beeck, A.O. and D.L. Eizirik, *Viral infections in type 1 diabetes mellitus — why the β cells?* Nature Reviews Endocrinology, 2016. **12**(5): p. 263-273.
 45. Wen, L., et al., *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1109-1113.
 46. Ilonen, J., et al., *Patterns of β -Cell Autoantibody Appearance and Genetic Associations During the First Years of Life*. Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3636-3640.
 47. Zipitis, C.S. and A.K. Akobeng, *Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Archives of Disease in Childhood, 2008. **93**(6): p. 512-517.
 48. Fronczak, C.M., et al., *In Utero Dietary Exposures and Risk of Islet Autoimmunity in Children*. Diabetes Care, 2003. **26**(12): p. 3237-3242.
 49. Shulman, L.M., et al., *Antibodies to islet cell autoantigens, rotaviruses and/or enteroviruses in cord blood and healthy mothers in relation to the 2010-2011 winter viral seasons in Israel: a pilot study*. Diabetic Medicine, 2014. **31**(6): p. 681-685.
 50. Culina, S., et al., *Materno-Fetal Transfer of Preproinsulin Through the Neonatal Fc Receptor Prevents Autoimmune Diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(10): p. 3532-3542.
 51. Lempainen, J., et al., *Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes*. Journal of Autoimmunity, 2009. **33**(2): p. 155-164.
 52. Graham, K.L., et al., *Pathogenic Mechanisms in Type 1 Diabetes: The Islet is Both Target and Driver of Disease*. The Review of Diabetic Studies, 2012. **9**(4): p. 148-168.
 53. Roep, B.O. and M. Peakman, *Antigen Targets of Type 1 Diabetes Autoimmunity*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(4): p. a007781-a007781.
 54. Li, M., L.-J. Song, and X.-Y. Qin, *Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2014. **18**(5): p. 749-758.
 55. Bending, D., P. Zaccane, and A. Cooke, *Inflammation and type one diabetes*. International Immunology, 2012. **24**(6): p. 339-346.

56. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-Cell Function and Migration — Two Sides of the Same Coin*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(14): p. 1020-1034.
57. Atkinson, M.A., et al., *How Does Type 1 Diabetes Develop?: The Notion of Homicide or -Cell Suicide Revisited*. Diabetes, 2011. **60**(5): p. 1370-1379.
58. Gagnerault, M.-C., et al., *Pancreatic Lymph Nodes Are Required for Priming of β Cell Reactive T Cells in NOD Mice*. The Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(3): p. 369-377.
59. Unanue, E.R., S.T. Ferris, and J.A. Carrero, *The role of islet antigen presenting cells and the presentation of insulin in the initiation of autoimmune diabetes in the NOD mouse*. Immunological Reviews, 2016. **272**(1): p. 183-201.
60. Santamaria, P., *The Long and Winding Road to Understanding and Conquering Type 1 Diabetes*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 437-445.
61. Parham, P., *The Immune System. Fourth Edition*. 2014, New York: Garland Science. 209-211.
62. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations*. Annual Review of Immunology, 2010. **28**(1): p. 445-489.
63. Azar, S.T., et al., *Type I (Insulin-Dependent) Diabetes Is a Th1- and Th2-Mediated Autoimmune Disease*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1999. **6**(3): p. 306-310.
64. Poulin, M. and K. Haskins, *Induction of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice by Th2 T Cell Clones from a TCR Transgenic Mouse*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(6): p. 3072-3078.
65. Walker, L.S.K. and M. von Herrath, *CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes*. Clinical & Experimental Immunology, 2015. **183**(1): p. 16-29.
66. Esensten, J.H., et al., *T-bet-Deficient NOD Mice Are Protected from Diabetes Due to Defects in Both T Cell and Innate Immune System Function*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(1): p. 75-82.
67. Nicoletti, et al., *Endogenous interleukin-12 only plays a key pathogenetic role in non-obese diabetic mouse diabetes during the very early stages of the disease*. Immunology, 1999. **97**(3): p. 367-370.
68. Serreze, D.V., et al., *Interferon-gamma receptor signaling is dispensable in the development of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2007-2011.
69. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nature Immunology, 2005. **6**(11): p. 1133-1141.
70. Emamullee, J.A., et al., *Inhibition of Th17 Cells Regulates Autoimmune Diabetes in NOD Mice*. Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1302-1311.
71. Baharlou, R., et al., *Elevated Levels of T-helper 17-associated Cytokines in Diabetes Type I Patients: Indicators for Following the Course of Disease*. Immunological Investigations, 2016. **45**(7): p. 641-651.
72. Kriegel, M.A., et al., *Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(28): p. 11548-11553.
73. Li, C.R., E.E. Mueller, and L.M. Bradley, *Islet Antigen-Specific Th17 Cells Can Induce TNF- α -Dependent Autoimmune Diabetes*. The Journal of Immunology, 2014. **192**(4): p. 1425-1432.

74. Kuriya, G., et al., *Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse*. *Diabetologia*, 2013. **56**(8): p. 1773-1780.
75. Joseph, J., et al., *IL-17 Silencing Does Not Protect Nonobese Diabetic Mice from Autoimmune Diabetes*. *The Journal of Immunology*, 2011. **188**(1): p. 216-221.
76. Bending, D., et al., *Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 2009. **119**(3): p. 565-572.
77. Martin-Orozco, N., et al., *Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells*. *European Journal of Immunology*, 2009. **39**(1): p. 216-224.
78. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. *Nature*, 1998. **392**(6676): p. 565-568.
79. Rollins, B.J., *Chemokines*. *Blood*, 1997. **90**(3): p. 909-928.
80. Mantovani, A., *The chemokine system: redundancy for robust outputs*. *Immunology Today*, 1999. **20**(6): p. 254-257.
81. Bonecchi, R., et al., *Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998. **187**(1): p. 129-134.
82. Langenkamp, A., et al., *Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4+ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells*. *European Journal of Immunology*, 2003. **33**(2): p. 474-482.
83. Cole, K.E., et al., *Interferon-inducible T Cell Alpha Chemoattractant (I-TAC): A Novel Non-ELR CXC Chemokine with Potent Activity on Activated T Cells through Selective High Affinity Binding to CXCR3*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998. **187**(12): p. 2009-2021.
84. Nakajima, C., et al., *Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN- γ stimulation*. *European Journal of Immunology*, 2002. **32**(6): p. 1792.
85. Frigerio, S., et al., *β cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis*. *Nature Medicine*, 2002. **8**(12): p. 1414-1420.
86. Willcox, A., et al., *Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2009. **155**(2): p. 173-181.
87. El-Sheikh, A., et al., *Both CD4+ and CD8+ T cells are Required for IFN- γ Gene Expression in Pancreatic Islets and Autoimmune Diabetes Development in Biobreeding Rats*. *Journal of Autoimmunity*, 1999. **12**(2): p. 109-119.
88. Phillips, J.M., et al., *Type 1 Diabetes Development Requires Both CD4+ and CD8+ T cells and Can Be Reversed by Non-Depleting Antibodies Targeting Both T Cell Populations*. *The Review of Diabetic Studies*, 2009. **6**(2): p. 97-103.
89. Miller B.J., A.M.C., O'Neil J.J., Wicker L.S., *Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice*. *Journal of Immunology*, 1988. **140**(1): p. 52-58.
90. Jeker, L.T., H. Bour-Jordan, and J.A. Bluestone, *Breakdown in Peripheral Tolerance in Type 1 Diabetes in Mice and Humans*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012. **2**(3): p. a007807-a007807.

91. Lebastchi, J. and K.C. Herold, *Immunologic and Metabolic Biomarkers of β -Cell Destruction in the Diagnosis of Type 1 Diabetes*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(6): p. a007708-a007708.
92. Pinkse, G.G.M., et al., *Autoreactive CD8 T cells associated with cell destruction in type 1 diabetes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(51): p. 18425-18430.
93. Skowera, A., et al., *CTLs are targeted to kill β cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope*. Journal of Clinical Investigation, 2008.
94. Schroder, K., *Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions*. Journal of Leukocyte Biology, 2003. **75**(2): p. 163-189.
95. Hinman, R.M. and J.C. Cambier, *Role of B Lymphocytes in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes*. Current Diabetes Reports, 2014. **14**(11): p. 543.
96. Hampe, C.S., *Protective role of anti-idiotypic antibodies in autoimmunity – Lessons for type 1 diabetes*. Autoimmunity, 2012. **45**(4): p. 320-331.
97. Wong, F.S., et al., *Investigation of the Role of B-Cells in Type 1 Diabetes in the NOD Mouse*. Diabetes, 2004. **53**(10): p. 2581-2587.
98. Silva, D.G., et al., *Anti-Islet Autoantibodies Trigger Autoimmune Diabetes in the Presence of an Increased Frequency of Islet-Reactive CD4 T Cells*. Diabetes, 2011. **60**(8): p. 2102-2111.
99. Wong, F.S. and L. Wen, *B Cells in Autoimmune Diabetes*. The Review of Diabetic Studies, 2005. **2**(3): p. 121-121.
100. Brodie, G.M., et al., *B-Cells Promote Intra-Islet CD8+ Cytotoxic T-Cell Survival to Enhance Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(4): p. 909-917.
101. Serreze, D.V., et al., *B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. Journal of Immunology, 1998. **161**(8): p. 3912-3918.
102. Martin, S., et al., *Development of Type 1 Diabetes despite Severe Hereditary B-Cell Deficiency*. New England Journal of Medicine, 2001. **345**(14): p. 1036-1040.
103. Calderon, B., A. Suri, and E.R. Unanue, *In CD4+ T-Cell-Induced Diabetes, Macrophages Are the Final Effector Cells that Mediate Islet β -Cell Killing*. The American Journal of Pathology, 2006. **169**(6): p. 2137-2147.
104. Underhill, D.M. and H.S. Goodridge, *Information processing during phagocytosis*. Nature Reviews Immunology, 2012. **12**(7): p. 492-502.
105. Li, M., et al., *Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes*. Experimental & Molecular Medicine, 2012. **44**(4): p. 260.
106. Zhang, Y., E. Bandala-Sanchez, and L.C. Harrison, *Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes*. Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity, 2012. **19**(4): p. 271-278.
107. Sarween, N., et al., *CD4 + CD25 + Cells Controlling a Pathogenic CD4 Response Inhibit Cytokine Differentiation, CXCR-3 Expression, and Tissue Invasion*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(5): p. 2942-2951.
108. Tang, Q., et al., *Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 687-697.

109. Marek-Trzonkowska, N., et al., *Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes*. *Pediatric Diabetes*, 2013. **14**(5): p. 322-332.
110. You, S., et al., *Autoimmune Diabetes Onset Results From Qualitative Rather Than Quantitative Age-Dependent Changes in Pathogenic T-Cells*. *Diabetes*, 2005. **54**(5): p. 1415-1422.
111. D'Alise, A.M., et al., *The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(50): p. 19857-19862.
112. Keenan, H.A., et al., *Residual Insulin Production and Pancreatic β -Cell Turnover After 50 Years of Diabetes: Joslin Medalist Study*. *Diabetes*, 2010. **59**(11): p. 2846-2853.
113. Liu, E.H., et al., *Pancreatic beta cell function persists in many patients with chronic type 1 diabetes, but is not dramatically improved by prolonged immunosuppression and euglycaemia from a beta cell allograft*. *Diabetologia*, 2009. **52**(7): p. 1369-1380.
114. Lepault, F. and M.C. Gagnerault, *L-selectin(-/lo) and diabetogenic T cells are similarly distributed in prediabetic and diabetic nonobese diabetic mice*. *Laboratory Investigations*, 1998. **78**(5): p. 551-558.
115. Bottini, N. and E.J. Peterson, *Tyrosine Phosphatase PTPN22: Multifunctional Regulator of Immune Signaling, Development, and Disease*. *Annual Review of Immunology*, 2014. **32**(1): p. 83-119.
116. Stanford, S.M., N. Rapini, and N. Bottini, *Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity*. *Immunology*, 2012. **137**(1): p. 1-19.
117. Palacios, E.H. and A. Weiss, *Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation*. *Oncogene*, 2004. **23**(48): p. 7990-8000.
118. Okada, M., *Regulation of the Src Family Kinases by Csk*. *International Journal of Biological Sciences*, 2012. **8**(10): p. 1385-1397.
119. Matthews, R.J., et al., *Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences*. *Molecular and Cellular Biology*, 1992. **12**(5): p. 2396-2405.
120. Wu, J., et al., *Identification of Substrates of Human Protein-tyrosine Phosphatase PTPN22*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(16): p. 11002-11010.
121. Vang, T., et al., *Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant*. *Nature Genetics*, 2005. **37**(12): p. 1317-1319.
122. Cloutier, J.F. and A. Veillette, *Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells*. *The EMBO Journal*, 1996. **15**(18): p. 4909-4918.
123. Gjørloff-Wingren, A., et al., *Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP*. *European Journal of Immunology*, 1999. **29**(12): p. 3845-3854.
124. Bottini, N., et al., *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes*. *Nature Genetics*, 2004. **36**(4): p. 337-338.
125. Bottini, N., et al., *Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases*. *Seminars in Immunology*, 2006. **18**(4): p. 207-213.
126. Vang, T., et al., *LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CSK*. *Nature Chemical Biology*, 2012. **8**(5): p. 437-446.

127. Fousteri, G., S.-N.C. Liossis, and M. Battaglia, *Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity*. *Clinical Immunology*, 2013. **149**(3): p. 556-565.
128. Rawlings, D.J., X. Dai, and J.H. Buckner, *The Role of PTPN22 Risk Variant in the Development of Autoimmunity: Finding Common Ground between Mouse and Human*. *The Journal of Immunology*, 2015. **194**(7): p. 2977-2984.
129. Sharp, R.C., et al., *Genetic Variations of PTPN2 and PTPN22: Role in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Crohn's Disease*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015. **5**.
130. Negishi, I., et al., *Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes*. *Nature*, 1995. **376**(6539): p. 435-438.
131. Hasegawa, K., *PEST Domain-Enriched Tyrosine Phosphatase (PEP) Regulation of Effector/Memory T Cells*. *Science*, 2004. **303**(5658): p. 685-689.
132. Zhang, J., et al., *The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness*. *Nature Genetics*, 2011. **43**(9): p. 902-907.
133. Dai, X., et al., *A disease-associated PTPN22 variant promotes systemic autoimmunity in murine models*. *Journal of Clinical Investigation*, 2013. **123**(5): p. 2024-2036.
134. Rieck, M., et al., *Genetic Variation in PTPN22 Corresponds to Altered Function of T and B Lymphocytes*. *The Journal of Immunology*, 2007. **179**(7): p. 4704-4710.
135. Zheng, P. and S. Kissler, *PTPN22 Silencing in the NOD Model Indicates the Type 1 Diabetes-Associated Allele Is Not a Loss-of-Function Variant*. *Diabetes*, 2012. **62**(3): p. 896-904.
136. Yeh, L.T., et al., *Different Modulation of Ptpn22 in Effector and Regulatory T Cells Leads to Attenuation of Autoimmune Diabetes in Transgenic Nonobese Diabetic Mice*. *The Journal of Immunology*, 2013. **191**(2): p. 594-607.
137. Zikherman, J., et al., *PTPN22 Deficiency Cooperates with the CD45 E613R Allele to Break Tolerance on a Non-Autoimmune Background*. *The Journal of Immunology*, 2009. **182**(7): p. 4093-4106.
138. Salmond, R.J., R.J. Brownlie, and R. Zamoyska, *Multifunctional roles of the autoimmune disease-associated tyrosine phosphatase PTPN22 in regulating T cell homeostasis*. *Cell Cycle*, 2015. **14**(5): p. 705-711.
139. Brownlie, R.J., et al., *Lack of the Phosphatase PTPN22 Increases Adhesion of Murine Regulatory T Cells to Improve Their Immunosuppressive Function*. *Science Signaling*, 2012. **5**(252): p. ra87-ra87.
140. Maine, C.J., et al., *PTPN22 Alters the Development of Regulatory T Cells in the Thymus*. *The Journal of Immunology*, 2012. **188**(11): p. 5267-5275.
141. Habib, T., et al., *Altered B Cell Homeostasis Is Associated with Type 1 Diabetes and Carriers of the PTPN22 Allelic Variant*. *The Journal of Immunology*, 2011. **188**(1): p. 487-496.
142. Meffre, E., *The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011. **1246**(1): p. 1-10.
143. Menard, L., et al., *The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans*. *Journal of Clinical Investigation*, 2011. **121**(9): p. 3635-3644.

144. Arechiga, A.F., et al., *Cutting Edge: The PTPN22 Allelic Variant Associated with Autoimmunity Impairs B Cell Signaling*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(6): p. 3343-3347.
145. Spalinger, M.R., et al., *Loss of Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 22 Regulates Interferon- γ -Induced Signaling in Human Monocytes*. Gastroenterology, 2013. **144**(5): p. 978-988.e10.
146. Wang, Y., et al., *The Autoimmunity-Associated Gene PTPN22 Potentiates Toll-like Receptor-Driven, Type 1 Interferon-Dependent Immunity*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 111-122.
147. Chang, H.H., et al., *PTPN22 Modulates Macrophage Polarization and Susceptibility to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis*. The Journal of Immunology, 2013. **191**(5): p. 2134-2143.
148. Hermann, R., et al., *Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes*. Diabetologia, 2006. **49**(6): p. 1198-1208.
149. Boechat, A.L., et al., *Association between the PTPN22 1858C/T gene polymorphism and tuberculosis resistance*. Infection, Genetics and Evolution, 2013. **16**: p. 310-313.
150. Gomez, L.M., J.-M. Anaya, and J. Martin, *Genetic Influence of PTPN22 R620W Polymorphism in Tuberculosis*. Human Immunology, 2005. **66**(12): p. 1242-1247.
151. Rhee, I. and A. Veillette, *Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity*. Nature Immunology, 2012. **13**(5): p. 439-447.
152. Burn, G.L., et al., *Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease?* FEBS Letters, 2011. **585**(23): p. 3689-3698.
153. Naser, S.A., et al., *Exploring the role of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: a pilot study*. Gut Pathogens, 2013. **5**(1): p. 14.
154. Nazareth, N., et al., *Prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Escherichia coli in blood samples from patients with inflammatory bowel disease*. Medical Microbiology and Immunology, 2015. **204**(6): p. 681-692.
155. Naser, S.A., D. Schwartz, and I. Shafran, *Isolation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients*. The American Journal of Gastroenterology, 2000. **95**(4): p. 1094-1095.
156. Naser, S.A., et al., *Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease*. The Lancet, 2004. **364**(9439): p. 1039-1044.
157. Vang, T., et al., *The autoimmune-predisposing variant of lymphoid tyrosine phosphatase favors T helper 1 responses*. Human Immunology, 2013. **74**(5): p. 574-585.
158. Kissler, S., et al., *In vivo RNA interference demonstrates a role for Nramp1 in modifying susceptibility to type 1 diabetes*. Nature Genetics, 2006. **38**(4): p. 479-483.
159. Sakaguchi, S., K. Wing, and T. Yamaguchi, *Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg*. European Journal of Immunology, 2009. **39**(9): p. 2331-2336.
160. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-1300.

161. Kahles, H., *Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population*. European Journal of Endocrinology, 2005. **153**(6): p. 895-899.
162. Fousteri, G., et al., *The protein tyrosine phosphatase PTPN22 controls forkhead box protein 3 T regulatory cell induction but is dispensable for T helper type 1 cell polarization*. Clinical & Experimental Immunology, 2014. **178**(1): p. 178-189.
163. Nowakowska, D.J. and S. Kissler, *Ptpn22 Modifies Regulatory T Cell Homeostasis via GITR Upregulation*. The Journal of Immunology, 2016. **196**(5): p. 2145-2152.
164. Turner, M., et al., *Enhanced PI3K/Akt-mediated survival of memory Th1 cells in type-1 diabetics and healthy controls carrying the autoimmunity-associated 1858T allelic variant of PTPN22 (P4097)*. The Journal of Immunology, 2016. **190**(1 Supplement): p. 133.2.
165. Baghbani, E., et al., *Suppression of protein tyrosine phosphatase PTPN22 gene induces apoptosis in T-cell leukemia cell line (Jurkat) through the AKT and ERK pathways*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **86**: p. 41-47.
166. Lazarevic, V., L.H. Glimcher, and G.M. Lord, *T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(11): p. 777-789.
167. Chodiseti, S.B., et al., *Triggering Through Toll-like Receptor 2 Limits Chronically Stimulated T-helper Type 1 Cells From Undergoing Exhaustion*. Journal of Infectious Diseases, 2014. **211**(3): p. 486-496.
168. Spalinger, M.R., et al., *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22 Modulates NOD2-Induced Cytokine Release and Autophagy*. PLoS ONE, 2013. **8**(8): p. e72384.
169. Chaparro, R.J. and T.P. DiLorenzo, *An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type 1) diabetes*. Expert Review of Clinical Immunology, 2010. **6**(6): p. 939-955.
170. Reed, J.C. and K.C. Herold, *Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM*. Nature Reviews Endocrinology, 2015. **11**(5): p. 308-314.
171. Sood, S., et al., *Loss of the Protein Tyrosine Phosphatase PTPN22 Reduces Mannan-Induced Autoimmune Arthritis in SKG Mice*. The Journal of Immunology, 2016. **197**(2): p. 429-440.
172. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 371-381.
173. Salmond, R.J., et al., *The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals*. Nature Immunology, 2014. **15**(9): p. 875-883.
174. Tree, T.I.M., B.O. Roep, and M. Peakman, *A Mini Meta-Analysis of Studies on CD4+CD25+ T cells in Human Type 1 Diabetes: Report of the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1079**(1): p. 9-18.
175. Jana, S., et al., *The Type of Responder T-Cell Has a Significant Impact in a Human In Vitro Suppression Assay*. PLoS ONE, 2010. **5**(12): p. e15154.
176. Schneider, A., et al., *The Effector T Cells of Diabetic Subjects Are Resistant to Regulation via CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(10): p. 7350-7355.

177. George, J.F., et al., *Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells Is Dependent on Expression of Heme Oxygenase-1 in Antigen-Presenting Cells*. The American Journal of Pathology, 2008. **173**(1): p. 154-160.
178. Serr, I., et al., *Type 1 diabetes vaccine candidates promote human Foxp3+Treg induction in humanized mice*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 10991.
179. Leete, P., et al., *Differential Insulinitic Profiles Determine the Extent of β -Cell Destruction and the Age at Onset of Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2016. **65**(5): p. 1362-1369.
180. Kodama, K., et al., *Tissue- and age-specific changes in gene expression during disease induction and progression in NOD mice*. Clinical Immunology, 2008. **129**(2): p. 195-201.
181. Loder, B.F., et al., *B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor-Derived Signals*. The Journal of Experimental Medicine, 1999. **190**(1): p. 75-90.
182. Patry, M., et al., *β ig-h3 Represses T-Cell Activation in Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(12): p. 4212-4219.
183. Hull, R.L., et al., *Hyaluronan: A Mediator of Islet Dysfunction and Destruction in Diabetes?* Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2015. **63**(8): p. 592-603.
184. Juergens, R., et al., *Imaging Biomarkers in Immunotherapy*. Biomarkers in Cancer, 2016: p. 1.
185. Gaglia, J.L., et al., *Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients*. Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(1): p. 442-445.
186. Williams, A.J.K., et al., *Pancreatic Volume Is Reduced in Adult Patients with Recently Diagnosed Type 1 Diabetes*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012. **97**(11): p. E2109-E2113.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ZEITLICHE ÜBERSICHT DER PATHOGENETISCHEN EREIGNISSE VON T1D.....	7
ABBILDUNG 2: DIFFERENZIERUNG VON NAIVEN T-ZELLEN	12
ABBILDUNG 3: DARSTELLUNG DER PATHOGENESE VON T1D	20
ABBILDUNG 4: PTPN22 IST EIN NEGATIVER REGULATOR DER PROXIMALEN SIGNALKASKADE DES TCRs IN CD4 ⁺ -ZELLEN	24
ABBILDUNG 5: FUNKTIONSWEISE DER SHRNA-EXPRESSIONSKASSETTE.....	39
ABBILDUNG 6: CD4 ⁺ -ZELLEN VON WT-, P2- UND P4-SPLENOZYTEN UNTER TH1- UND TH17- DIFFERENZIERUNG	52
ABBILDUNG 7: SPLENOZYTEN UNTER TH1-DIFFERENZIERUNG	53
ABBILDUNG 8: SPLENOZYTEN UNTER TH17-DIFFERENZIERUNG	55
ABBILDUNG 9: NAIVE CD4 ⁺ -ZELLEN VON WT-, P2- UND P4-SPLENOZYTEN UNTER TH1- UND TH17- DIFFERENZIERUNGEN	56
ABBILDUNG 10: NAIVE T-ZELLEN UNTER TH1-DIFFERENZIERUNG	57
ABBILDUNG 11: NAIVE T-ZELLEN UNTER TH17-DIFFERENZIERUNG	59
ABBILDUNG 12: TH1-DIFFERENZIERUNG VON NAIVEN T-ZELLEN IN GEGENWART VON APCs MIT UND OHNE DOXYCYCLIN	60
ABBILDUNG 13: TH17-DIFFERENZIERUNG VON NAIVEN T-ZELLEN IN GEGENWART VON APCs MIT UND OHNE DOXYZYKLIN	61
ABBILDUNG 14: WIRKUNG VON TREG-ZELLEN AUF DIE PROLIFERATION VON TH1-ZELLEN	63
ABBILDUNG 15: WIRKUNG VON TREG-ZELLEN AUF DIE PROLIFERATION VON TEFF-ZELLEN	64
ABBILDUNG 16: EINFLUSS VON PTPN22-STILLEGUNG AUF DIE <i>IN-VIVO</i> -VERTEILUNG UND ZYTOKINPRODUKTION VON IMMUNZELLEN IM PANKREAS	67
ABBILDUNG 17: EINFLUSS VON PTPN22-STILLEGUNG AUF DIE <i>IN-VIVO</i> -VERTEILUNG UND ZYTOKINPRODUKTION VON IMMUNZELLEN IM PANKREATISCHE LYMPHKNOTEN.....	69
ABBILDUNG 18: EINFLUSS VON PTPN22-STILLEGUNG AUF DIE <i>IN-VIVO</i> -VERTEILUNG UND ZYTOKINPRODUKTION VON IMMUNZELLEN IN DER MILZ	71

Danksagung

Mein Dank geht an Stephan Kissler für das großzügige Angebot meine praktischen Untersuchungen für diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen sowie seine umfassende Betreuung der Dissertation. Während meiner Zeit in Boston stand Stephans Tür immer offen bei Fragen und Problemen. Mein Dank gilt ebenfalls dem Kissler-Lab-Team, das mir mit Rat und Anleitung zur Durchführung der Experimente zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Bayer Science & Education Foundation für ihr Vertrauen und die Verleihung eines Carl-Duisberg-Stipendiums bedanken ohne welches mein Forschungsaufenthalt in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre.

Im Speziellen gilt mein Dank ebenfalls Prof. Dr. rer. nat. Manfred Lutz für die Betreuung der Doktorarbeit sowie Priv.-Doz. Dr. Dr. med. Ulf Meyer-Hoffert für seinen Rat und sein Mentoring. Zusätzlich bedanke ich mich bei Frau Viktoria Rücker aus dem Institut für klinische Epidemiologie und Biometrie der Universität Würzburg für die Beantwortung so vieler statistischer Fragen.

Mein Dank gilt nicht zuletzt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich persönlich unterstützt haben bei der Entscheidung nach Boston zu gehen.