

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

**Direktor: Professor Dr. med. C.P. Speer**



**Polarisierbarkeit von peripheren T-Zellen nach Stimulation mit  
diabetesspezifischen Antigenen bei Patienten mit T1DM und gesunden  
Kontrollpersonen**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Lena Marie Jakob**

aus Leimen

**Würzburg, Januar 2020**

**Referentin:** Prof. Dr. med. Martina Prelog

**Korreferentin:** Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

12. Oktober 2020

**Die Promovendin ist Ärztin**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation mit dem Titel „Polarisierbarkeit von peripheren T-Zellen nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen bei Patienten mit T1DM und gesunden Kontrollpersonen“ eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen wurde.

Leimen, Januar 2020

# Inhaltverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Diabetes mellitus Typ 1 .....	1
1.1.1. Definition.....	1
1.1.2. Klassifikation.....	1
1.1.3. Epidemiologie .....	2
1.1.4. Ätiologie.....	2
1.1.5. Diagnostik.....	3
1.1.6. Therapieziele und Therapie .....	4
1.1.6.1. Therapieziele.....	4
1.1.6.2. Insulintherapie.....	5
1.1.6.3. Glukoseselbstkontrolle .....	6
1.1.6.4. Ernährungskennntnisse .....	6
1.1.6.5. Schulungen .....	7
1.1.6.6. Psychosoziale Betreuung.....	7
1.2. Die Rolle des Immunsystems.....	7
1.2.1. Das erworbene Immunsystem .....	8
1.2.2. Reifung der T-Zellen im Thymus.....	9
1.2.3. T-Zell Aktivierung und Differenzierung.....	10
1.2.4. T-Helferzellen .....	14
1.2.4.1. Th1-Zellen.....	15
1.2.4.2. Th17-Zellen.....	16
1.2.4.3. Regulatorische T-Zellen .....	16
1.2.4.4. Plastizität der T-Helferzellen .....	17
1.2.5. Entwicklung einer Autoimmunität am Beispiel vom T1DM.....	19

1.2.6.	Aktuelle Erkenntnisse aus murinen Experimenten.....	21
1.3.	Zielsetzung und Fragestellung .....	22
2.	Material und Methoden .....	23
2.1.	Materialien.....	23
2.1.1.	Geräte, Softwares und Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.2.	Puffer, Medien und gebrauchsfertige Lösungen .....	26
2.1.3.	Materialien für Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung .....	28
2.1.4.	Materialien für DNA/RNA Isolierung, Reverse Transkription und rtPCR .....	29
2.1.5.	Kit für die Zytokinmessung aus Überstand .....	31
2.2.	Methoden .....	31
2.2.1.	Ethische Voraussetzungen .....	31
2.2.2.	Gesunde Kontrollprobanden (HD) .....	32
2.2.3.	Diabetes mellitus Typ 1 Patienten (EM/LS) .....	32
2.2.4.	Lymphozytenisolierung mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation .....	33
2.2.5.	Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer .....	34
2.2.6.	Kryokonservierung.....	35
2.2.7.	Antigenstimulation und In-vitro-Zellkultur.....	36
2.2.8.	Durchflusszytometrie .....	37
2.2.8.1.	Extrazelluläre Fluoreszenzfärbung .....	39
2.2.9.	Zytokinproduktionsmessung mit FlowCytomix Pro3 .....	42
2.2.9.1.	Messung und Analyse der Zytokinproduktion.....	43
2.2.10.	DNA/RNA Isolierung.....	44
2.2.11.	Reverse Transkription .....	45
2.2.12.	Real-Time PCR .....	45

2.3.	Statistische Auswertung .....	47
3.	Ergebnisse .....	48
3.1.	Charakterisierung der Kohorten HD, EM und LS .....	48
3.2.	Polarisierbarkeit der Th-Subpopulationen in HD, EM und LS.....	53
3.2.1.	CD4-positive Th-Subpopulationen .....	56
3.2.2.	CD8-positive Th-Subpopulationen .....	65
3.3.	Analyse der Polarisierbarkeit der Chemokinrezeptor-positiven T-Zellen. .....	70
3.3.1.	Chemokinrezeptor-positive CD4+-T-Zellen.....	70
3.3.2.	Chemokinrezeptor-positive CD8+-T-Zellen.....	73
3.4.	Analyse der Transkriptionsfaktoren Tbet, RORc und FoxP3.....	75
3.4.1.	Relative Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren Tbet, RORc und FoxP3 .....	76
3.4.2.	Korrelationsanalyse zwischen Transkriptionsfaktoren und verschiedenen Th-Subpopulationen .....	79
3.5.	Polarisierbarkeit der Zytokinproduktion der PBMCs in HD, EM und LS .. .....	88
3.5.1.	Th1-spezifischen Zytokine .....	89
3.5.2.	Th17-spezifische Zytokine .....	93
3.5.3.	Treg-spezifische Zytokine .....	97
3.5.4.	Th2-spezifische Zytokine .....	100
4.	Diskussion .....	105
4.1.	Th-Subpopulationen.....	105
4.1.1.	CD4-positive Th-Subpopulationen .....	105
4.1.2.	CD8-positive Th-Subpopulationen .....	109
4.2.	Polarisierbarkeit der Chemokinrezeptor-positiven T-Zellen.....	113
4.2.1.	Chemokinrezeptor-positive CD4+-T-Zellen.....	113

4.2.2.	Chemokinrezeptor-positive CD8+-T-Zellen.....	116
4.3.	Transkriptionsfaktoren.....	118
4.3.1.	Relative Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren Tbet, Rorc und Foxp3 .....	118
4.3.2.	Zusammenfassung und Limitationen von der qPCR-Messung...	121
4.4.	Zytokine.....	122
4.4.1.	Th1-spezifische Zytokine .....	122
4.4.2.	Th17-spezifische Zytokine .....	125
4.4.3.	Treg-spezifische Zytokine .....	127
4.4.4.	Th2-spezifische Zytokine .....	128
4.4.5.	Zusammenfassung und Limitationen Zytokine .....	129
4.5.	Technische Limitationen.....	130
4.5.1.	Heterogenität der Gruppen .....	130
4.5.2.	Unterteilung der Subpopulationen .....	130
4.5.3.	Untersuchung von peripheren T-Lymphozyten .....	130
4.5.4.	In-vitro Zellkultur .....	131
5.	Ausblick .....	132
6.	Zusammenfassung .....	134
7.	Tabellenverzeichnis .....	137
8.	Abbildungsverzeichnis .....	140
9.	Literaturverzeichnis.....	143
10.	Anhang	
10.1.	Danksagung	
10.2.	Lebenslauf	

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgemeinschaft
AIRE	Autoimmun-Regulator-Gen
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cy7
APC-H7	Allophycocyanin-H7
B2M	β2-Mikroglobulin
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serum Albumin
BV	engl. Brilliant Violet
CCL	C-C Chemokinligand
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CD	engl. Cluster of differentiation
CD62L	L-Selektin
CXCL	C-X-C Chemokinligand
CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor
cDNA	engl. complementary Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celcius
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succimidylester
CT	engl. threshold cycle
CTL	engl. cytotoxic T Lymphocyte
CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor
DC	Dendritische Zelle
dest	destilliert
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA)	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Erstmanifestierte Typ-1-Diabetiker



FBS	Fetales Bovines Serum
FCS	Fetales Kälber Serum
FoxP3	engl. Forkhead-Box-Protein P3
FSC	engl. Forward Scatter
GAD65	Glutamat-Decarboxylase 65
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HbA1c	Hämoglobin A1c
HD	engl. Healthy donors
HLA	engl. Human Leukocyte Antigen
IA-2	Tyrosin-Phosphatase
IAA	Humanes Insulin-Antigen, Insulin-Autoantikörper
IAA-Ak	Insulinautoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
l	Liter
LADA	engl. Latente Autoimmune Diabetes in Adults
LFA	engl. Leucocyte function associated molecule
LPS	Lipopolysaccharid
LS	Long-Standing Typ-1-Diabetiker
Max	Maximum
mg	Milligramm
MHC	engl. Major histocompatibility complex
µl	Mikroliter
min	Minuten
Min	Minimum
ml	Milliliter
mmol	Millimol

MODY	engl. Maturity onset Diabetes of the young
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
NTP	Nukleosidtriphosphat
nTregs	natürliche regulatorische T-Zelle
OGTT	Oraler Glucosetoleranztest
PBMC	engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	engl. Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pe-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
Pen	Penicillin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PET 2	Polyglanduläre Endokrinopathie Typ 2
PHA	Phytohemagglutinin
qPCR	engl. real-time Polymerase chain reaction
RDB	engl. Reagent Dilution Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RORC	engl. RAR-related orphan receptor C
rpm	engl. revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rt	engl. real-time
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
β-2M	β-2-Mikroglobulin
SSC	engl. Side Scatter
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	engl. Signal Transducers and Activators of Transcription
Strep	Streptomycin

T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab	Tabelle
T-bet	engl. T-box protein expressed in T-cells
TCM	engl. Central memory cells T-cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEM	engl. Effector memory T-cells
TGF	engl. Transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TLR	engl. Toll like receptors
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSLP	engl. thymic stromal-derived lymphopoietin
vs	versus
WHO	engl. World Health Organisation
ZnT8	Zinktransporter

# 1. Einleitung

## 1.1. Diabetes mellitus Typ 1

### 1.1.1. Definition

Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) ist eine chronische Autoimmunkrankheit, die mit einer Störung des Stoffwechsels einhergeht. Beim T1DM werden die insulinproduzierenden Beta-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas progredient vom körpereigenen Immunsystem zerstört. Dies führt, je nach Individuum, innerhalb weniger Monate oder Jahre zum absoluten Insulinmangel und infolge dessen zu einer Hyperglykämie. Der T1DM tritt meistens im Kinder- und Jugendalter auf, kann sich jedoch auch im Erwachsenenalter manifestieren (Latent Autoimmune Diabetes in Adults, LADA) [1-3].

### 1.1.2. Klassifikation

Der Diabetes mellitus lässt sich in mehrere Unterformen klassifizieren. Die verschiedenen Charakteristika sind in Tabelle 1 dargestellt [1, 3-5].

Diabetes-form	Pathogenese	Erkrankungs-zeitpunkt	Antikörper	Anmerkungen
Typ 1	Beta-Zelldestruktion führt zum absoluten Insulinmangel	Meist im Kindes- und Jugendalter	meistens ja	Häufig mit anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert
Typ 2	Insulinresistenz, Sekretorischer Defekt, Apoptose der Beta-Zellen, Verminderte Insulinsekretion	Meist im hohen Erwachsenenalter	nein	Häufig mit dem Metabolischen Syndrom assoziiert
Gestationsdiabetes	Schwangerschaftshormone wie z.B. Cortisol und Östrogen verursachen eine Insulinresistenz	In der Schwangerschaft	nein	OGTT bei jeder Schwangeren zwischen der 24. und 28. SSW
Typ 3 (= andere Diabetes-formen)	z.B. MODY (genetischer Defekt der Beta-Zellfunktion, autosomal-dominant)	Vor dem 25. Lebensjahr	nein	11 verschiedene MODY-Formen

Tabelle 1: Klassifizierung des Diabetes mellitus. Abkürzungen: Oraler Glukosetoleranztest (OGTT), Schwangerschaftswoche (SSW), Maturity onset Diabetes of the young (MODY)

### **1.1.3. Epidemiologie**

In Deutschland sind ungefähr 6,5 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Davon leiden jedoch mehr als 95 % an Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) und nur weniger als 5 % an T1DM [6, 7].

Die Anzahl von T1DM Patienten im Kinder- und Jugendalter in Nordrhein-Westfalen wird auf durchschnittlich 245 pro 100.000 Menschen geschätzt. Deutschlandweit wird von einer Inzidenzrate von 22,9 pro 100.000 Personenjahren ausgegangen, was 2.200 Neuerkrankungen pro Jahr entspricht.

Die Prävalenz von erwachsenen Typ-1-Diabetikern liegt deutschlandweit geschätzt bei 312.000, was eine Inzidenzrate von 5,7 pro 100.000 Personenjahren ausmacht [8, 9].

Es gibt außerdem regionale Unterschiede in den Inzidenzen und Prävalenzen. Hier weist Deutschland höhere Zahlen auf als andere europäische Länder. Zudem zeigt sich, dass die Inzidenzrate in Westdeutschland höher ist als in Ostdeutschland. Die Gründe dafür sind bislang noch ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen [10]. Die Krankheitsform Typ-1 ist für 90 % der Diabetesfälle bei Kindern und Jugendlichen, aber nur für 5 % der Diabetesfälle im Erwachsenenalter verantwortlich [11].

### **1.1.4. Ätiologie**

Der T1DM kann in einen immunologisch vermittelten (Typ-1a) und einen idiopathischen vermittelten (Typ-1b) Diabetes eingeteilt werden.

Beim immunologisch vermittelten T1DM (Typ-1a) werden die Beta-Zellen des Pankreas von Abwehrzellen des eigenen Immunsystems zerstört und es resultiert ein absoluter Insulinmangel [1]. Es wird vermutet, dass dies durch ein Zusammenspiel prädisponierender Gene (HLA-DR-3/4) und verschiedener Umweltfaktoren, wie zum Beispiel Viren, geschieht. Meist setzen durch den resultierenden Insulinmangel nach wenigen Monaten erste Krankheitszeichen ein [12]. Dieser Autoimmunvorgang kann in verschiedene Stadien eingeteilt

werden und geht mit einer Erhöhung von diabetesspezifischen Antikörpern (ICA, IAA, GAD65, IA-2, ZnT8) einher [1]. Wenn sich der Insulinmangel bei Erwachsenen über viele Jahre erstreckt und nur mäßige Hyperglykämien verursacht, spricht man von LADA, einer Unterform des Typ1a-Diabetes [1].

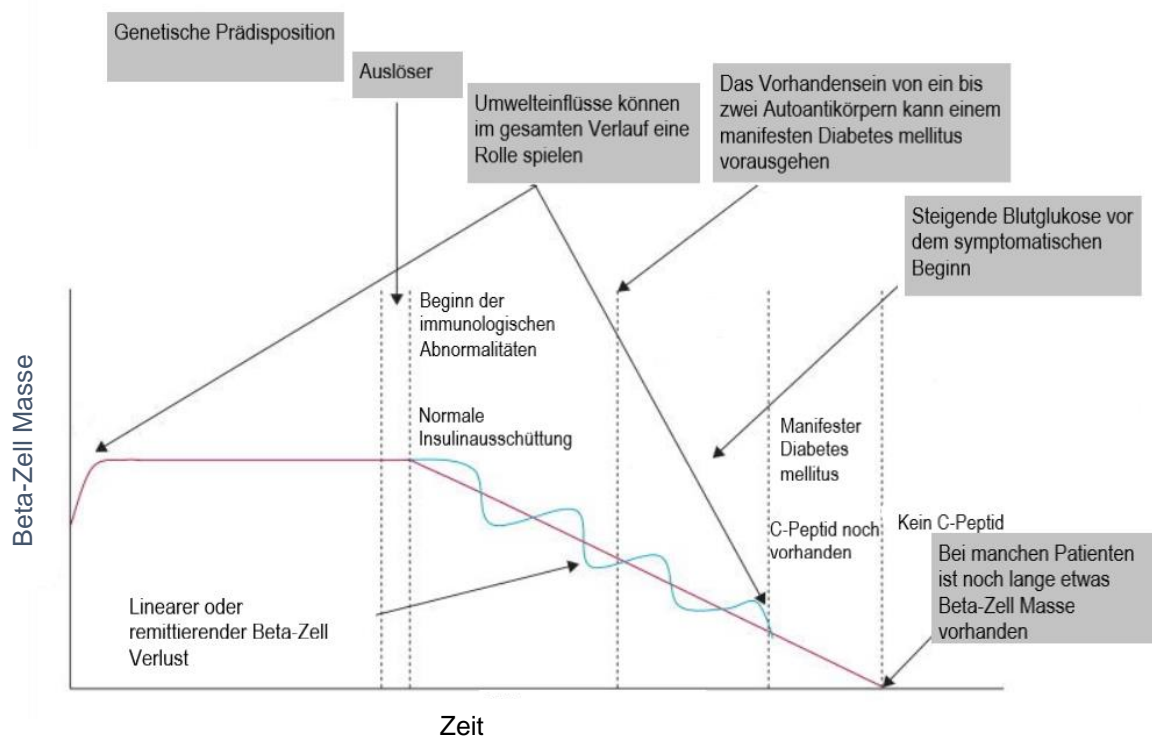


Abbildung 1: Beispielhaftes Schaubild über die Pathogenese des immunologisch vermittelten T1DM (Typ-1a). Abgebildet sind die Einflussfaktoren und ihre Auswirkungen auf die Beta-Zell Masse und somit auf die Entstehung des T1DM über die Zeit. Modifiziert nach [13].

Der idiopathische T1DM (Typ-1b) weist weder eine Assoziation zu HLA-Risikoallelen auf, noch lassen sich diabetesspezifische Antikörper nachweisen. Diese Form tritt mit hoher Penetranz, jedoch insgesamt sehr selten auf. Die meisten Patienten sind asiatischer oder afrikanischer Herkunft [1].

T1DM Patienten haben außerdem ein hohes Risiko andere Autoimmunerkrankungen zu entwickeln, wie zum Beispiel Hashimoto, Vitiligo oder Zöliakie [1].

### 1.1.5. Diagnostik

Die klinische Symptomatik spielt bei der Erstmanifestation des T1DM eine große Rolle. Die klassischen Symptome sind Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und

Gewichtsverlust. Um die Diagnose T1DM zu bestätigen, muss eines der folgenden Diagnosekriterien erfüllt sein:

- Gelegenheits-Plasmaglukosewert von  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l)
- Nüchtern-Plasmaglukose von  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7,0$  mmol/l) (nach 8 h Nahrungskarenz)
- HbA1c  $\geq 6,5$  % ( $\geq 48$  mmol/mol) [14].

Zur Abgrenzung und Differenzialdiagnostik des T1DM ist zusätzlich eine Autoantikörpertestung im Blut des Patienten indiziert (autoimmun vs. idiopathisch, T2DM vs. LADA) [1]. Diese serologischen Marker sind:

- Insulinautoantikörper (IAA-Ak)
- Inselzellantikörper (ICA)
- Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase der Beta-Zellen (GAD65)
- Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase (IA-2) und IA-2 $\beta$
- Autoantikörper gegen Zink-Transporter 8 der Beta-Zelle (ZnT8).

Bei 85-90 % der T1DM Patienten ist mindestens ein Autoantikörper im Blut erhöht. Bei gleichzeitiger Bestimmung mehrerer Autoantikörper steigt die Nachweisbarkeit auf bis zu 98 % [15].

Da beim T1DM, im Gegensatz zum T2DM, die Insulinproduktion zum Erliegen kommt und das C-Peptid ein Teil des Proinsulins ist und in gleicher Menge wie Insulin aus dem Pankreas abgegeben wird, ist dieses ein weiteres differentialdiagnostisches Mittel. Beim T1DM sind folglich meist erniedrigte C-Peptid Werte nachweisbar ( $< 0,5$  nmol/l) [16].

## **1.1.6. Therapieziele und Therapie**

### **1.1.6.1. Therapieziele**

Bei der Behandlung des T1DM gibt es viele verschiedene individuelle Therapieziele, die erreicht werden sollen. Zum einen sollte das Risiko für makro- und mikroangiopathische diabetesassoziierte Folgeschäden reduziert werden und zum anderen sollte die Lebensqualität der Patienten, trotz des

aufwendigen Therapieregimes, aufrechterhalten werden. Gleichzeitig ist es wichtig, dass der Patient die Erkrankung akzeptiert und die Pathophysiologie versteht, denn nur dann ist der Patient zufrieden und es ist mit einer erfolgsversprechenden Compliance zu rechnen.

Die Therapieziele von T1DM Patienten sind sehr individualisiert und dementsprechend unterschiedlich sieht die Therapieform aus. Es sollten hyperglykämische Entgleisungen wie Ketoazidosen und zudem schwerwiegende Hypoglykämien vermieden werden, da diese das Risiko für Folgeschäden deutlich erhöhen. Als Messwert dient der HbA1c-Wert, der bei Erwachsenen  $\leq 7,5\%$  sein sollte [1].

Die Therapiekomponenten sind Insulintherapie, Glukoseselbstkontrolle, Ernährungskennntnisse, Schulungen und eine psychosoziale Betreuung.

#### 1.1.6.2. **Insulintherapie**

Da beim T1DM ein absoluter Insulinmangel vorliegt, ist eine lebenslange Insulintherapie indiziert. Hier unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Therapiestrategien. Beide haben gemeinsam, dass sowohl die basale als auch die postprandiale Insulinversorgung gewährleistet wird [16]. Um das Ziel der durchgängigen Insulinversorgung zu erreichen, werden bei den unterschiedlichen Therapieformen verschiedene Insuline benutzt.

Bei der konventionellen Therapie kommen meistens Mischinsuline zum Einsatz, die sowohl die kurzfristige als auch die langfristige Insulinversorgung abdecken. Dafür ist es jedoch notwendig, verbindliche Vorgaben bezüglich der Mahlzeitenmenge, des Zeitpunkts und der Insulindosis einzuhalten. Diese Strategie wird lediglich bei Patienten empfohlen, die mit den Anforderungen der anderen Therapieform nicht zurechtkommen, da die Patienten keinem flexiblen Alltag nachgehen können.

Die intensivierete Insulintherapie hingegen sollte der Behandlungsstandard sein und besteht aus einer kombinierten Substitution von kurzwirksamen Bolusinsulin zu den Mahlzeiten und langwirksamen Basalinsulin für die Grundversorgung (Basal-Bolus-Prinzip). Diese Form der Therapie erfordert eine gute Mitarbeit und



viel Wissen über die Erkrankung, was durch strukturierte Diabeteschulungen angeeignet werden sollte. Resultierend ist eine flexible Lebensgestaltung möglich. Eine Sonderform der intensivierten Insulintherapie ist die Therapie mit einer Insulinpumpe. Mithilfe eines Katheters wird eine programmierte kontinuierliche Insulininfusion in das subkutane Gewebe injiziert und somit nicht nur eine hohe Flexibilität, sondern auch eine bessere Blutglukoseeinstellung gewährleistet. Bei dieser Therapiestrategie kommen lediglich kurzwirksame Insuline zum Einsatz. Die Dosierung kann jederzeit an den täglichen Bedarf angepasst werden [1, 17].

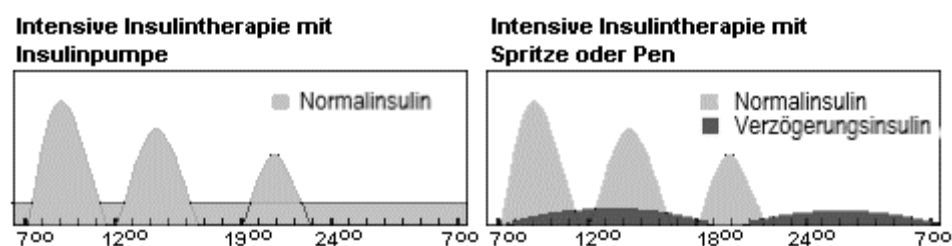


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Therapieformen der intensivierten Insulintherapie. In der linken Abbildung mithilfe einer Insulinpumpe und in der rechten Abbildung mithilfe einer Spritze oder Pens. Auf der x-Achse ist die Uhrzeit dargestellt und die y-Achse zeigt den Insulinspiegel an. Modifiziert nach [18].

Wichtig ist, für jeden Patienten, die für ihn passendste Therapieform für eine optimale Blutzuckereinstellung zu finden. Die Wahl der Therapie hängt von den Blutzuckerwerten, den Anforderungen, den Bedürfnissen und den Wünschen der einzelnen Patienten ab [1].

#### 1.1.6.3. Glukoseselbstkontrolle

Die Blutzuckermessungen sollten in regelmäßigen Abständen, mehrmals pro Tag, durchgeführt werden. Dies ist die Voraussetzung für eine zufriedenstellende Blutzuckereinstellung.

#### 1.1.6.4. Ernährungskennnisse

Die Patienten sollten die Glukosewirksamkeit von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen einschätzen können, um die richtige Insulindosis zu spritzen. Typ-1-Diabetiker müssen keine spezielle Diät einhalten, dennoch profitieren sie hinsichtlich der Folgeschäden von einer gesunden Ernährung. Eine gute und ausführliche Beratung ist hierbei unerlässlich.

#### 1.1.6.5. **Schulungen**

Da die Therapiemaßnahmen selbstverantwortlich umgesetzt werden müssen, ist es sehr wichtig, dass die Patienten gute Kenntnisse und Fertigkeiten im Bezug auf ihre Therapie besitzen. Diese werden sofort nach Diagnosestellung in strukturierten Patientenschulungen vermittelt, damit die Patienten sich selbständig therapieren können. Dies steigert die Lebensqualität und befähigt die Patienten den Diabetes bestmöglich in ihr Leben zu integrieren. Oftmals ist es auch von großer Bedeutung, Bezugspersonen und Angehörige in die Schulungen miteinzubeziehen, damit auch das Umfeld des Erkrankten sich gut auskennt und in Notsituationen helfen kann.

#### 1.1.6.6. **Psychosoziale Betreuung**

Menschen mit T1DM weisen oftmals als Komorbidität affektive Störungen oder Essstörungen auf, die wiederum einen negativen Einfluss auf das Diabetes-Selbstmanagement haben. Deshalb ist es wichtig die Patienten psychosozial zu betreuen und ihnen zu helfen mit der chronischen Krankheit umzugehen [1].

### **1.2. Die Rolle des Immunsystems**

Immunität im biologischen Sinne bedeutet Schutz und Unverletzlichkeit des Organismus vor Infektionskrankheiten und nicht-infektiösen körperfremden Substanzen. Der Begriff leitet sich von dem lateinischen Wort *immunis* (= frei sein von) ab [19]. Das Immunsystem beruht auf unspezifischen, angeborenen Abwehrmechanismen und einer adäquaten, erworbenen Immunantwort. Das angeborene Immunsystem umfasst verschiedene physikalische (z.B. Haut) und biologische (z.B. Phagozytose) Schutzmechanismen und ist die natürliche Resistenz einer Spezies. Überwinden Pathogene die äußere Schutzbarriere reagieren die Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten) sofort und werden von löslichen Komponenten wie dem Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine und Zytokinen bei der Immunabwehr unterstützt. Hierbei bildet sich kein immunologisches Gedächtnis. Das erworbene Immunsystem

hingegen reagiert selektiv und gezielt auf verschiedene Reize. Es besteht aus in Körperflüssigkeiten befindlichen spezifischen Antikörpern, die von B-Lymphozyten produziert werden (humorale Immunität) und spezifischen T-Lymphozyten (zellvermittelte Immunität). Zudem bildet es ein immunologisches Gedächtnis, das dem Körper eine Immunität gegenüber einer Reinfektion verleiht und im Falle dieser schneller und stärker gegen das Pathogen vorgehen kann [20-22].

### **1.2.1. Das erworbene Immunsystem**

Beim erworbenen Immunsystem wird zwischen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterschieden. Beide besitzen klonal verteilte Antigenerezeptoren, die die molekulare Grundlage für die außerordentliche Unterscheidungsfähigkeit des erworbenen Immunsystems darstellen [21].

Die B-Lymphozyten sind thymusunabhängig und reifen im Knochenmark (bone marrow). Sie besitzen membranverankerte B-Zell-Rezeptoren, die spezifische Antigene binden. Nach der Aktivierung differenzieren sich die B-Zellen entweder zu antikörperbildenden Plasmazellen (2.000 Antikörper/s) oder zu spezifischen sensibilisierten Gedächtniszellen.

Die T-Lymphozyten reifen im Thymus und es wird zwischen CD4+-T-Helferzellen (Th) und CD8+-zytotoxischen T-Zellen (CTLs) unterschieden. Die CD4+-Zellen binden ausschließlich Major Histocompatibility Complex (MHC)-2-Moleküle, deren Expression auf professionelle Antigen-präsentierende-Zellen (APC) beschränkt ist, wohingegen die CD8+-Zellen die MHC-1-Moleküle binden, die auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert werden. Alle T-Lymphozyten besitzen klonal verteilte T-Zell-Rezeptoren (TCR), die ihr spezifisches Antigen binden und resultierend zu einer Immunreaktion führen. Während die T-Helferzellen die Immunantwort optimieren, indem sie mit Hilfe von Chemokinen B-Zellen aktivieren oder Makrophagen helfen, Mikroorganismen zu eliminieren, töten die CTLs infizierte Zellen. Die T-Helferzellen lassen sich nochmals in verschiedene Subpopulationen unterteilen wie Th1, Th2, Th9 und Th17-Zellen, die unterschiedliche Funktionen in der Immunantwort einnehmen. Eine weitere

Untergruppe sind die regulatorischen T-Zellen (Treg), die entgegengesetzt wirken und die Immunantwort supprimieren [19, 23].

### **1.2.2. Reifung der T-Zellen im Thymus**

Die T-Vorläuferzellen wandern in einem sehr frühen Vorläuferstadium aus dem Knochenmark in den Thymus. Dies gelingt mithilfe der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR9 und ihren Chemokinliganden CXCL12 und CCL25. Der Thymus ist ein lymphatisches Organ, das hinter dem Brustbein liegt und früh in der Embryonalentwicklung entsteht. Bis zur Pubertät behält er seine absolute Größe und erreicht seine maximale T-Zell-Produktion bevor er sich anschließend kontinuierlich zurückbildet. Der Thymus besteht aus zwei in Verbindung stehenden Lappen, die wiederum durch Trabekel in einzelne Läppchen unterteilt werden. Jedes Läppchen besitzt einen äußeren Rindenbereich und eine innen liegende Markregion. Die Reifung der Thymozyten erfolgt von außen nach innen [21].

Nachdem die T-Vorläuferzellen im Thymus angelangt sind, regulieren diese CCR9 herunter und wandern in die äußere Rindenregion. Die ersten Thymozyten tragen weder das für die T-Lymphozyten spezifische Oberflächenmolekül Cluster of Differentiation (CD)3, noch die Korezeptoren CD4 oder CD8 (doppelt negativ). Stattdessen tragen sie auf ihrer Oberfläche CD44 und c-Kit. Nach circa einer Woche proliferieren die Thymozyten und exprimieren den Interleukin(IL)-2-Rezeptor CD25. Gleichzeitig werden CD44 und c-Kit herunter reguliert. Die T-Vorläuferzellen entwickeln sich durch verschiedene Umlagerungsschritte ihrer TCRs in zwei unterschiedliche T-Zell-Typen. Beim Menschen tragen 3-10 % der T-Lymphozyten den  $\gamma\delta$ -TCR ( $\gamma\delta$ -Zellen) und über 90 % den  $\alpha\beta$ -TCR ( $\alpha\beta$ -Zellen). Die reifen  $\gamma\delta$ -Zellen wandern anschließend in die Peripherie, während die Reifung der  $\alpha\beta$ -T-Vorläuferzellen zu immunkompetenten T-Zellen mehrere Selektionsprozesse erfordert [21]. Zunächst wandern die doppelpositiven T-Zellen (CD4+ und CD8+) in die innere Region der Rinde, wo dicht aneinander liegende Epithelzellen MHC-Klasse-1-Moleküle und MHC-Klasse-2-Moleküle präsentieren. Alle Thymozyten, die an keinen der beiden MHC-Moleküle binden, werden aussortiert

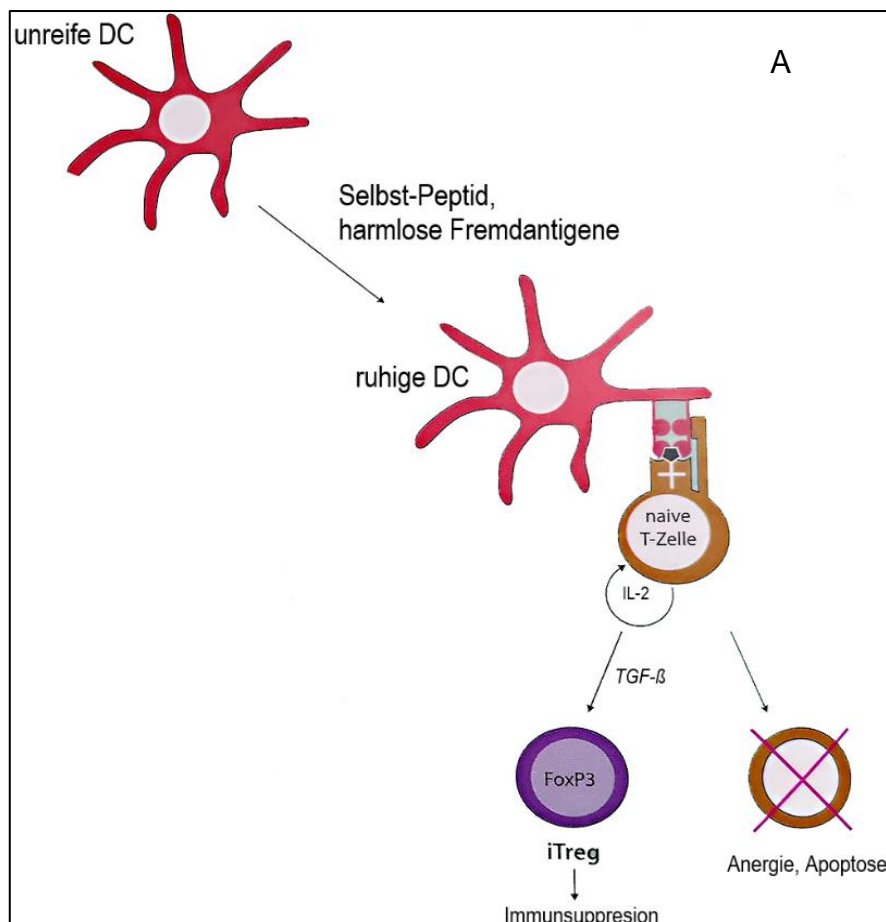
und müssen sterben (positive Selektion). Gleichzeitig bestimmt dieser Selektionsprozess die Art des zukünftig exprimierten Co-Rezeptors, indem die Zellen, die MHC-2 binden, CD8 verlieren und somit zu einfach positiven CD4+-T-Zellen werden und die Zellen die MHC-1 binden CD4 verlieren und zu CD8+-T-Zellen werden [24]. Neben diesen Subpopulationen entsteht noch eine kleine Population, die regulatorische T-Zelle, die den Transkriptionsfaktor FoxP3 und das Oberflächenmolekül CD25 stark exprimiert. Über die Entwicklungs- und Selektionsschritte dieser Zellen ist noch wenig bekannt.

Der zweite Selektionsschritt erfolgt mit den einfach positiven T-Lymphozyten und findet sowohl in der Rinde als auch im Mark statt. Reagiert der TCR der T-Lymphozyten auf Selbst-Peptide, die von MHC-Molekülen der dendritischen Zellen, Makrophagen und Thymuszellen präsentiert werden, sterben diese ab (negative Selektion). Mithilfe des Autoimmun-Regulator-Gens AIRE, das in Thymusepithelzellen exprimiert wird, können periphere Gewebsantigene im Thymus präsentiert und somit eine Toleranz gegenüber Proteinen in der Peripherie gebildet werden. Im Falle eines AIRE-Gendefekts können Autoimmunerkrankungen entstehen [25]. Ein Teil der CD4+-T-Zellen überleben und differenzieren sich zu natürlichen regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+FoxP3+) (natürliche Toleranz, siehe Kapitel 1.2.4.3.) [22]. Das endgültige Resultat der Selektionsprozesse (positive und negative Selektion) sind immunkompetente, einfach positive, reife T-Zellen, die anhand ihres Korezeptors unterschieden werden können [26].

### **1.2.3. T-Zell Aktivierung und Differenzierung**

Die naiven Lymphozyten zirkulieren anschließend in der peripheren Blutbahn und gelangen von dort nur über die postkapillären hochendothelialen Venolen (HEV) in die T-Zell-Zonen der Lymphknoten. Das koordinierte Zusammenspiel vom Chemokinrezeptor 7 (CCR7) und seinem Liganden CCL19 und dem Leukozyten-Selektin (CD62L) entscheidet, welche T-Lymphozyten in die peripheren lymphatischen Gewebe einwandern sollen. In der parakortikalen Zone des Lymphknotens treffen die naiven CD4+- oder CD8+-T-Zellen auf antigenpräsentierende Zellen (APC). Hier erfolgt das sogenannte Priming. Im

Falle der CD4+-T-Helferzelle nimmt diese mit jeder dendritischen Zelle antigenunabhängig Kontakt auf und tastet mit ihrem TCR die MHC-2-Moleküle nach spezifischen Peptiden ab. Sobald die T-Zelle den MHC-2-Molekül-Peptid-Komplex spezifisch erkannt hat, erfolgt Signal 1 und es entsteht eine immunologische Synapse, die zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt und einen schnellen Informationsaustausch von Zytokinen ermöglicht. Damit die aktivierte T-Helferzelle überleben und proliferieren kann, ist Signal 2 notwendig. Hierfür binden die kostimulierenden B7-Moleküle CD80 und CD86, die auf der dendritischen Zelle hochreguliert werden, das auf den naiven T-Helferzellen exprimierten CD28 und induzieren zusammen mit Signal 1 die Produktion von IL-2 und die Expression von IL-2R (CD25). IL-2 veranlasst die T-Helferzelle zur Proliferation und leitet die Polarisierung zu kurzlebigen, selektiven, hochaktiven T-Effektorzellen ein.



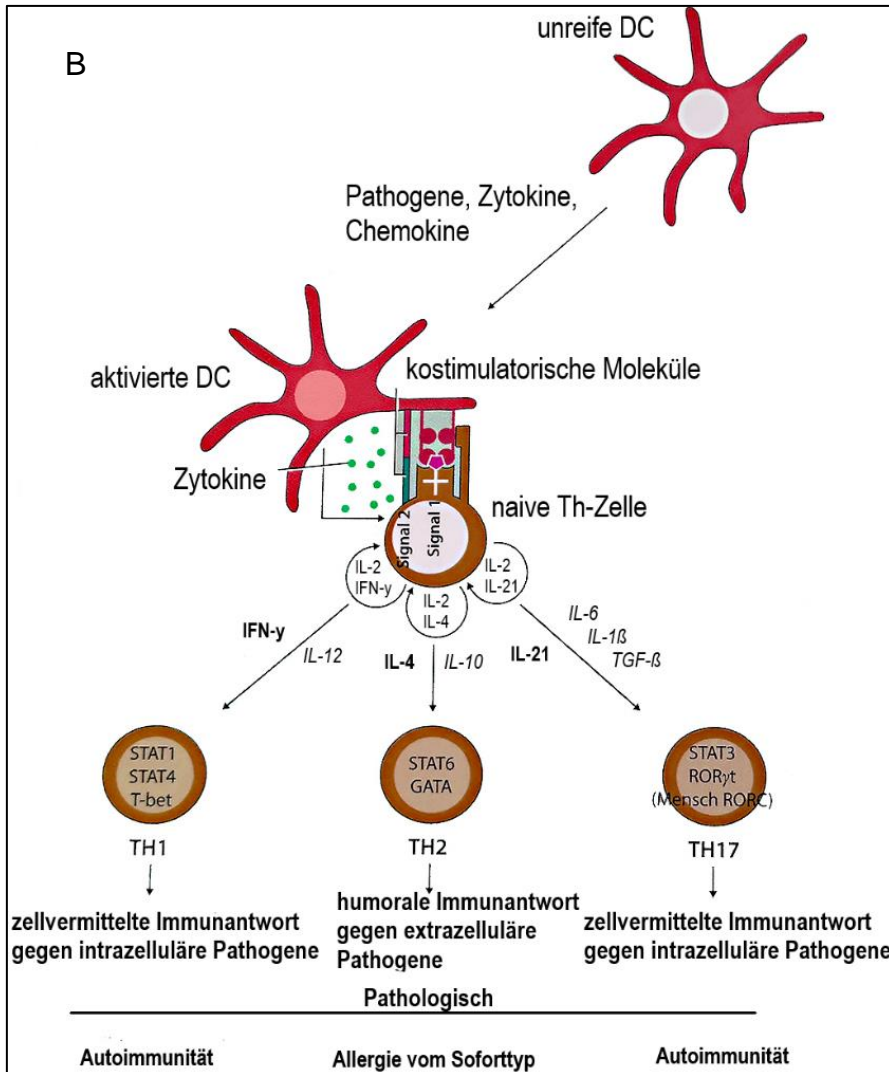


Abbildung 3: Die Bildung von T-Helferzellen im Rahmen einer Immunantwort. (A) Die Erkennung von Selbst-Peptiden etc. durch DCs bei gleichzeitigem Fehlen von kostimulierenden Faktoren resultiert in Anergie, Apoptose oder der Bildung von induzierten regulatorischen T-Zellen, die für die Immunsuppression zuständig sind. (B) Nach Aktivierung der unreifen DC durch Pathogene etc. wandern die aktivierten DC in Lymphknoten und präsentieren dort mithilfe der MHC-2-Moleküle den naiven CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen Antigene. Je nach Art des Antigens und des sezernierten Zytokins induzieren die DC die Differenzierung in unterschiedliche Th-Subtypen (Th1, Th2, Th17). Die von den DC sezernierten Zytokine sind links vom Pfeil und fett dargestellt und die Zytokine, die von den naiven Th-Zellen sezerniert werden sind rechts vom Pfeil abgebildet. Innerhalb der Th-Subpopulationen stehen die Transkriptionsfaktoren, die in den Zellen aktiviert werden. Jede Zelle produziert unterschiedliche Zytokine und sorgt somit für unterschiedliche Immunantworten. Die Rolle der Zellen bei Pathologien ist unterhalb des waagrechten Strichs beschrieben. Die Abbildung ist modifiziert nach [21]. Abkürzungen: Dendritische Zelle (DC), induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg), T-Helferzelle (Th), Interferon (IFN), Transforming growth factor (TGF), Interleukin (IL)

Wie in Abbildung 3 dargestellt, entscheidet die Art der sezernierten Zytokine unter anderem über die Richtung der weiteren T-Zell-Differenzierung (Th1, Th2, Th9, Th17, Treg) (siehe Kapitel 1.2.4.) [19, 21, 22].

Die meisten naiven T-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) sterben nach der abgelaufenen Immunreaktion ab. Ein Teil davon überlebt jedoch und entwickelt sich zu einer

T-Gedächtniszelle (CD45RA-CD28+). Andere T-Gedächtniszellen bilden sich während der primären Immunreaktion direkt aus naiven T-Zellen. Die T-Gedächtniszellen besitzen eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD127 (IL-7R), da sie permanent mit IL-7 stimuliert werden müssen, um eine dauerhafte Immunität zu gewährleisten [22]. Bei erneutem Antigenkontakt eines Erregers sorgen sie dafür, dass die Immunantwort schneller und stärker abläuft und somit die Erkrankung schwächer verläuft (sekundäre Immunantwort). Die T-Gedächtniszellen werden in Effektor-Gedächtniszellen  $T_{EM}$  (CD45RA-CCR7-CD28+) und zentrale Gedächtniszellen  $T_{CM}$  (CD45RA-CCR7+CD28+) unterteilt. Die  $T_{EM}$  exprimieren kein CCR7 und kein L-Selektin und wandern somit nicht in die sekundär lymphatischen Gewebe ein. Dafür bewegen sie sich mithilfe von Homingrezeptoren (CLA-4, LFA-1) im Blut und Gewebe und sorgen bei erneuter Antigenexposition durch eine schnelle und hohe Zytokinausschüttung (IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-5) für eine effizientere Sekundärreaktion. Die  $T_{CM}$  hingegen exprimieren CCR7 und L-Selektin und produzieren IL-2. Sie befinden sich hauptsächlich in den peripher lymphatischen Organen und reagieren sehr empfindlich auf von DCs-präsentierte Antigene. Durch Hochregulierung der kostimulierenden Moleküle und der Zytokinproduktion, proliferieren sie schnell und differenzieren sich zu T-Effektorlymphozyten. Die TEMRA haben ohne die Zytokine IL-7 und IL-15 eine sehr geringe proliferative Kapazität. Sie haben eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Apoptose und sezernieren IFN- $\gamma$ , aber fast kein IL-2. Sie werden dementsprechend als endständig differenzierte Effektorzellen bezeichnet [27].

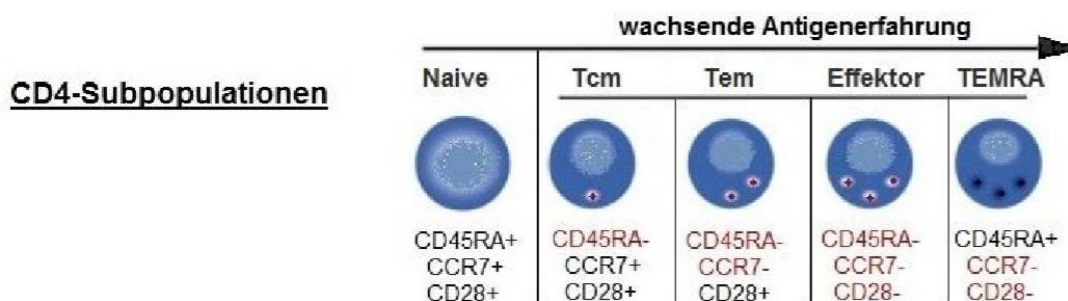


Abbildung 4: Darstellung der CD4+-Subpopulationen. Nachdem naive T-Zellen mit Antigenen in Kontakt gekommen sind, verlieren diese den Oberflächenmarker CD45RA, werden zu Gedächtniszellen und verlieren bei weiterer Stimulation den Kostimulationsfaktor CD28, um zu Effektorzellen zu werden. Durch Reexpression von CD45RA entstehen TEMRA. Modifiziert nach [28]. Abkürzungen: Cluster of Differentiation (CD), C-Chemokinrezeptor (CCR), Central memory cells T-cells (Tcm), Effector memory T-cells (Tem)



Des Weiteren können Immunzellen, Endothelzellen und Fibroblasten chemotaktische Zytokine, Chemokine, sezernieren. Diese locken im Falle einer Entzündung Monozyten, Lymphozyten und Leukozyten mit entsprechenden Chemokinrezeptoren an. Diese Fähigkeit spielt eine bedeutsame Rolle bei der Immunregulation. Es gibt zehn verschiedene CC-Chemokinrezeptoren, bei denen sich im N-terminalen Bereich zwei benachbarte Cysteinreste befinden und sieben CXC-Chemokinrezeptoren. Hier sind die Cysteinreste durch eine Aminosäure getrennt. Die verschiedenen T-Helferzellen tragen unterschiedliche Chemokinrezeptoren. So spielen CXCR3 und CCR5 eine große Rolle bei einer Th1-dominierenden T-Zellantwort [29-31], wohingegen CCR6 auf Th17-Zellen und Tregs exprimiert wird [19, 32].

#### **1.2.4. T-Helferzellen**

Wie bereits im vorigen Kapitel 1.2.3. erwähnt, werden je nach umliegender Zytokinkombination verschiedene signalvermittelnde Transkriptionsfaktoren und Proteine in der naiven T-Helferzelle aktiviert. Diese Aktivierung führt schließlich zur Bildung von verschiedenen Th-Subpopulationen (Th1, Th2, Th9, Th17, Treg). Da bereits bekannt ist, dass bei Autoimmunerkrankungen die Th1, Th17 und Treg von besonderer Bedeutung sind, wollen wir uns im Folgenden auf diese Subpopulationen konzentrieren [33-35]. In Tabelle 2 sind die Eigenschaften der verschiedenen Zellreihen dargestellt.

Population	Stimuliert durch	Leitzytokin	Transkriptionsfaktor	Funktion	Abwehr von	Rolle bei Infektion
<b>Th1</b>	IL-12 IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ TNF $\alpha$	T-bet	Aktivierung von Makrophagen	Intrazellulären Erregern, Viren, Protozoen	Chronische Entzündung, Autoimmunität
<b>Th2</b>	IL-4	IL-4 IL-5 IL-13	Gata4	Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen Alternative auch: Makrophagen	Extrazelluläre Erregern, Parasiten	Allergie
<b>Th17</b>	IL-6 IL-23 TGF- $\beta$	IL-17 IL-22 IL-23	RORc	Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen	Extrazellulären Erregern und Pilzen	Autoimmunität, Entzündung
<b>Treg</b>	TGF- $\beta$ IL-2	IL-10 TGF $\beta$	FoxP3	Suppression von T-Zellen und APC	Überschießender Entzündung und Immunantworten	Autoimmunität

Tabelle 2: Eigenschaften der Subpopulationen der T-Zellen. Abkürzungen: T-Helferzelle (Th), Interleukin (IL), Interferon (IFN), Tumornekrosefaktor (TNF), Transforming growth factor (TGF), T-box protein (T-bet), RAR-related orphan receptor C (RORc), Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3)

#### 1.2.4.1. Th1-Zellen

Die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu Th1-Zellen erfolgt hauptsächlich durch die Stimulation mit IL-12 und IFN- $\gamma$ . IL-12 wird von APCs synthetisiert, die zuvor Kontakt zu bakteriellen (bakterientypische CpG-DNA, LPS, BCG) und viralen (dsRNA) Komponenten hatten. IFN- $\gamma$  wird hingegen von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und von bereits differenzierten Th1-Zellen sezerniert. Diese beiden Zytokine induzieren und aktivieren die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT4 und T-bet und bewirken somit die Differenzierung zur Th1-Zelle. Da T-bet nicht nur durch IFN- $\gamma$  verstärkt exprimiert wird, sondern auch die IFN- $\gamma$ -Produktion fördert, kommt es zu einer positiven Verstärkung der Th1-Differenzierung. Die primäre Aufgabe der Th1-Zellen ist es, die Zytotoxizität von CTLs und NK-Zellen mit Hilfe von IFN- $\gamma$  zu steigern, B-Zellen zur Produktion von zytotoxischen Immunglobulin (Ig)G zu stimulieren und für eine stark proinflammatorische, zelluläre Immunantwort zu sorgen. Wenn die Th1-Zellen der zentralen und peripheren Toleranz entgehen, können sie außerdem eine zellvermittelte Autoimmunreaktion auslösen [19, 22].

#### 1.2.4.2. Th17-Zellen

Th17-Zellen entstehen durch Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1, IL-6, IL-23 und TGF- $\beta$ . IL-1 und IL-6 werden von APCs produziert, die zuvor mit Bakterien und Pilzen in Kontakt gekommen sind. TGF- $\beta$ , welches eigentlich ein antiinflammatorisches Zytokin ist, wird von verschiedenen Zellen produziert und fördert in Verbindung mit IL-1 oder IL-6 die Th17-Differenzierung. Intrazellulär induzieren diese Zytokine die Transkription von STAT3 und RORc. RORc codiert für IL-21, welches wiederum die Proliferation von Th-17 Zellen steigert und somit die Differenzierung verstärkt. IL-23 wirkt erst später auf die Th-17 Zellen ein und stabilisiert diese. Funktionell sind die Th-17 Zellen durch Produktion von IL-17 und IL-22 für die Rekrutierung von Leukozyten zum Infektionsort verantwortlich. IL-22 steigert die Integrität/Barrierefunktion der epithelialen Gewebszellen in der Haut und im Gastrointestinaltrakt. Bei der Entstehung einer Autoimmunkrankheit, werden autoreaktive Th-17 Zellen, die gegen spezifische Antigene gerichtet sind, aktiviert und produzieren das proinflammatorische Zytokin IL-17. Dieses führt in Kombination mit IFN- $\gamma$  zu einer T-Zell-vermittelten Entzündung und durch Aktivierung der CTLs zum Untergang von Gewebe. Beim T1DM richten sich autoreaktive T-Zellen gegen diabetesspezifische Antigene auf den insulinproduzierenden Beta-Zellen des Pankreas und führen im Folgenden zum absoluten Insulinmangel [22, 35].

#### 1.2.4.3. Regulatorische T-Zellen

Damit das autoaggressive Potenzial des Immunsystems kontrolliert, unterdrückt und eine Immunreaktion auch wieder abgeschaltet werden kann, benötigt es verschiedene Mechanismen und regulierende T-Zellen. In Kapitel 1.2.2. wurde die zentrale Toleranz bereits beschrieben. Ergänzt wird diese durch die periphere Toleranz. Diese wird neben Anergie und Apoptose unter anderem durch regulatorische T-Zellen gewährleistet [21, 33]. Diese lassen sich in natürliche Tregs ( $n$ Tregs) und induzierte Tregs ( $i$ Tregs) unterteilen.  $i$ Tregs werden als Reaktion auf Selbst-Antigene, die von unreifen, nicht aktivierten APCs präsentiert werden, gebildet. Wichtig hierbei ist die Anwesenheit von TGF- $\beta$  und die Abwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen und kostimulierenden

Faktoren [22]. Die iTregs, bestehend aus mehreren Subpopulationen (Tr1-Zelle und Th3-Zellen), entstehen im Verlauf einer Immunantwort in peripher lymphatischen Organen und sind mehrheitlich für die Regulation der Immunreaktion verantwortlich. Im Gegensatz dazu, entstehen die natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTregs) im Thymus unter dem Einfluss von thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) und zeichnen sich durch eine hochaffine Bindung an Selbst-Peptide aus, die dort von den Thymozyten präsentiert werden. Die nTregs sorgen durch antigenspezifische Unterdrückung und Elimination autoreaktiver Zellen mit ähnlicher Spezifität für Selbst-Toleranz. Sie machen im peripheren Blut circa 5-15 % der zirkulierenden CD4+-T-Zellen aus. Die Immunsuppression erfolgt überwiegend durch direkten Zellkontakt. Alle Tregs, außer der Tr1-Zelle, zeichnen sich durch die Transkription von FoxP3, die hohe Expression von CD25 (IL-2-Rezeptor) und die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  aus [21]. Zum Überleben und Proliferieren benötigen sie IL-2. TGF- $\beta$  unterdrückt zum einen die Entstehung der anderen T-Helferzellen, fördert die Entstehung von weiteren iTregs und unterstützt postinflammatorisch Reparaturvorgänge im Gewebe. IL-10 hemmt die aktivierten DCs und T-Zellen. Die Funktion der Tregs besteht also darin, die Immunreaktion gegen einen pathologischen Erreger zuzulassen, aber gleichzeitig eine überschießende Immunreaktion zu verhindern. Obwohl sich das Verständnis der Tregs im Rahmen der Entstehung einer Autoimmunerkrankung in den letzten Jahren deutlich erweitert hat [36-39], gilt es, weitere Untersuchungen durchzuführen, um noch mehr Informationen zu erlangen.

#### 1.2.4.4. **Plastizität der T-Helferzellen**

Die Differenzierung in die in den vorigen Kapiteln beschriebenen Subpopulationen schien vor Jahren noch linear und irreversibel zu sein. So wurde davon ausgegangen, dass sich die Th1- und Th2-Zellen gegenseitig kontrollieren, indem die Aktivierung von Th1-Zellen durch IL-12 zur Hemmung von Th2-Zellen (negative Rückkopplung) führt. Auch die Produktion von IL-4 und die Expression von Gata3 und T-bet schien negativ rückgekoppelt [40]. Es wurde vermutet, dass eine Th1-Zelle nur IFN- $\gamma$  produziert und kein IL-4 oder IL-17. Zur Ausbildung von Th17- und Treg-Zellen aus naiven T-Zellen wurde hingegen

TGF- $\beta$  benötigt. Die Differenzierung zur FoxP3<sup>+</sup>-Th17-Zelle erfolgte in Kombination mit IL-6 und IL-21, zur RORc-Treg-Zelle mit IL-2. FoxP3 und RORc schienen auch gegensätzlich aktiv zu sein und sich gegenseitig zu blockieren [41, 42]. All diese Annahmen ließen vermuten, dass sich die T-Helferzelle unidirektional ausdifferenziere.

Nach heutigem Kenntnisstand lässt sich jedoch sagen, dass der Phänotyp und das Zytokinprofil der Zellen in murinen Experimenten und in vitro nicht endgültig sind und die Th-Zellen ihre Eigenschaften erweitern oder verändern können. Die Mechanismen der T-Zell-Plastizität sind vielfältig und komplex. Einen entscheidenden Einfluss auf die Plastizität der T-Zelle hat das Zytokinmilieu, dem die Zelle ausgesetzt ist und die Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors der Zelle. Diese Aktivität hängt vom epigenetischen Methylierungszustand spezifischer Histone ab [43, 44]. Es ist bekannt, dass alle T-Subpopulationen über alle Transkriptionsfaktoren verfügen, diese jedoch supprimiert oder aktiviert werden können. So ist zum Beispiel, wie in Abbildung 5 dargestellt, in Th1-Zellen der Tbet-Lokus (IFN- $\gamma$ ) permissiv methyliert, bei Th17-Zellen, der RORc-Lokus (IL-17) und bei Treg der FoxP3-Lokus. Die dazugehörigen antagonistischen Genloki sind gleichzeitig supprimiert [45, 46].

Besonders flexibel sind die Th17-Zellen. Kumar et al. fanden heraus, dass es Th17-Zellen gibt, die zum Beispiel IL-17/IFN- $\gamma$ , ROR $\gamma$ t/Tbet oder FoxP3/IL-17/ROR $\gamma$ t koexprimieren [45]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Th17-Zellen in Anwesenheit von IL-12 und Abwesenheit von TGF- $\beta$  zu Th1-Zellen konvertiert werden können, da sie weniger IL-17 produzierten und dafür vermehrt IFN- $\gamma$  [47]. Außerdem konnten FoxP3-exprimierende-Treg-Zellen in IL-17-produzierenden-Th17-Zellen umgewandelt werden. Die Differenzierung erfolgte mithilfe von IL-6 [48]. Zusätzlich wurden IFN- $\gamma$  produzierende Th17-Zellen [49] gefunden, genauso wie IL-4 produzierende Th17-Zellen. Diese Th-17 Zellen scheinen noch aggressiver zu sein als die konventionellen Phänotypen [50]. Insgesamt lässt sich sagen, dass ein Phänotypenwechsel

zwischen allen Subpopulationen denkbar ist und es gilt herauszufinden, ob diese Multifunktionalität für den Organismus schädlich oder nützlich ist.

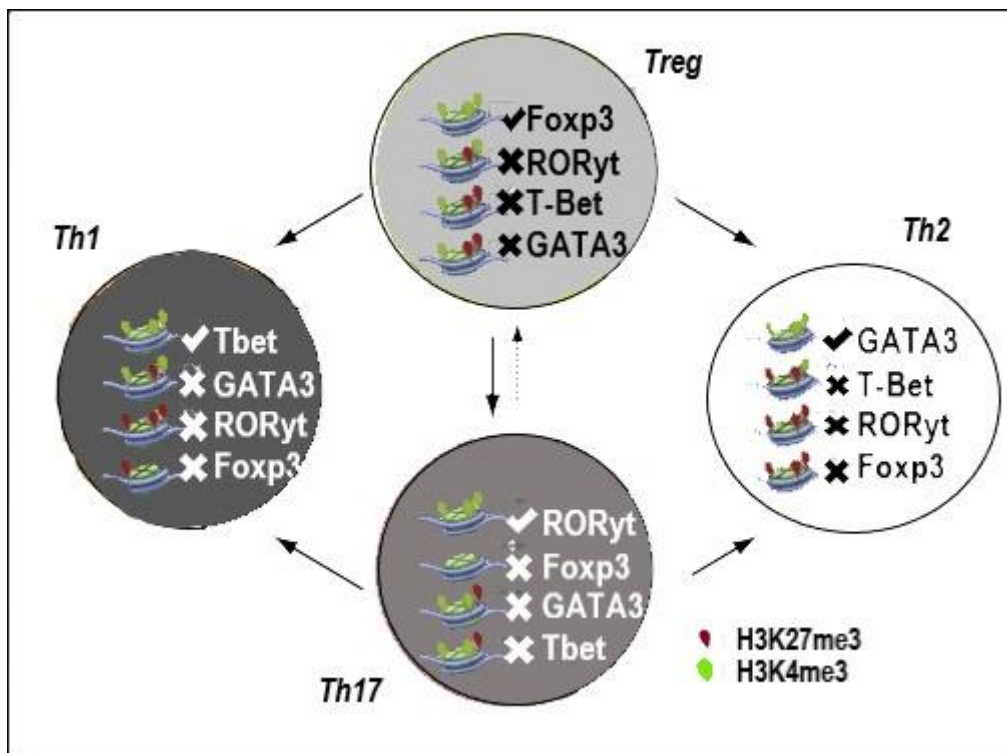


Abbildung 5: Epigenetischer Status der spezifischen transkriptionellen Regulator-Gen-Loci in CD4+-T-Zellen. Der molekulare Mechanismus der Plastizität kann mit balancierten, bivalenten epigenetischen Zuständen (H3K4me3 permissiv und H3K27me4 repressiv) am Transkriptionsregulator (z.B. FoxP3) Gen-Loci zusammenhängen. Modifiziert nach [46]. Abkürzungen: T-Helferzelle (Th), regulatorische T-Zelle (Treg), RAR-related orphan receptor C (RORc), Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3), T-box protein expressed in T-cells (Tbet)

Da ein Ungleichgewicht der Subpopulationen zu verschiedenen Erkrankungen führen kann, ist es enorm wichtig, dass diese im relativen Gleichgewicht zueinanderstehen. So kann zum Beispiel ein Übergewicht von Th1- und Th17-Zellen zu Autoimmunerkrankungen wie dem T1DM oder Psoriasis führen. Wohingegen ein Überwiegen von Tregs zu chronischen Infektionen führen kann [51].

### 1.2.5. Entwicklung einer Autoimmunität am Beispiel vom T1DM

Der Begriff Autoimmunität (von griech. auto = selbst) bezeichnet den Angriff von selbst gerichteten Antikörpern und autoreaktiven T-Zellen des Immunsystems gegen körpereigene Antigene (Autoantigene). Sie kann zu schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen führen, die ein Organ oder mehrere Organe betreffen.

betreffen [52]. Ursächlich dafür sind Störungen in der zentralen (siehe Kapitel 1.2.2) und peripheren Toleranz (siehe Kapitel 1.2.4.3.). Letzteres beinhaltet verschiedene Mechanismen wie klonale Deletion, Anergie, induzierte regulatorische T-Zellen und Apoptose [21, 53]. Andere Faktoren, die zur Entwicklung einer Autoimmunität beitragen, sind genetische Prädisposition und Umwelteinflüsse, wie Infektionen oder Gewebsschäden [22].

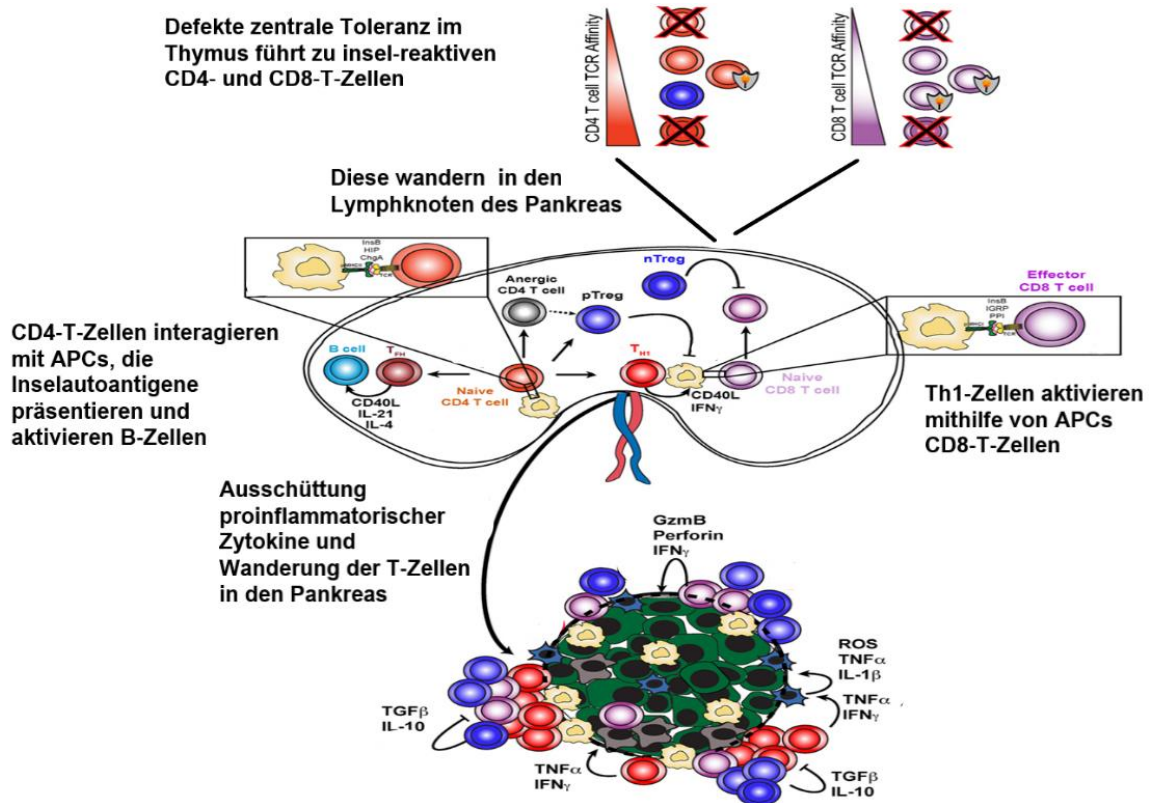


Abbildung 6: Ursachen für die Autoimmunität beim T1DM. Eine defekte zentrale Toleranz ermöglicht es, dass insel-reaktive CD4- und CD8-T-Zellen aus dem Thymus in die Lymphknoten des Pankreas wandern. Dort interagieren sie mit APCs, die Inselautoantigene präsentieren und stimulieren B-Zellen Autoantikörper zu produzieren. Durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wandern die autoreaktiven T-Zellen in den Pankreas, wo sie wiederum Zytokine produzieren und den Beta-Zelltod induzieren. Modifiziert nach [54]. Abkürzungen: T-Zell-Rezeptor (TCR), regulatorische T-Zellen (Treg), T-Helferzelle (Th), Interferon (IFN), Tumornekrosefaktor (TNF), Granzym (Gzm), Transforming growth factor (TGF), Interleukin (IL)

Wie in Abbildung 6 zu erkennen, greifen beim T1DM inselzellspezifische CD4+- und CD8+-T-Zellen bestimmte Antigene (GAD65, IA-2, IAA, ZnT8) in den insulinproduzierenden Beta-Zellen des Pankreas an und zerstören diese. Während die CD8+-T-Zellen die Beta-Zellen direkt töten, indem sie mit ihrem TCR das MHC-1-Molekül auf den Beta-Zellen binden, bilden die in den Pankreas infiltrierenden CD4+-T-Zellen inflammatorische Zytokine und aktivieren

B-Lymphozyten, die ihrerseits Autoantikörper bilden und wiederum die Lymphozyten stimulieren. Außerdem werden durch die Zytokinproduktion Makrophagen aktiviert, die in die Bauchspeicheldrüse wandern. Bei der Entwicklung des T1DM spielen außerdem sowohl genetische Prädispositionen wie der HLA-Haplotyp DR4/DQ8, als auch Umwelteinflüsse wie Infektionen eine große Rolle. Es gibt bereits Therapieansätze, die zum Beispiel die induzierten T-Effektorzellen hemmen und die regulatorischen T-Zellen erhalten sollen, um die Autoimmunreaktion zu hemmen oder zu verhindern. Da die Inzidenz des T1DM jedoch weiterhin steigt und es noch viel Bedarf an der Entwicklung und Validierung von immunmodulierenden Strategien gibt, die entweder das Fortschreiten des T1DM vor der kompletten Zerstörung der Beta-Zellen verhindern oder sogar eine Erholung der Beta-Zellen bewirken, ist die Polarisierbarkeit der CD4+- und CD8+-T-Zellen auf Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen Gegenstand dieser Promotionsarbeit [53].

#### **1.2.6. Aktuelle Erkenntnisse aus murinen Experimenten**

Viele Studien werden an NOD-Mäusen, dem wichtigsten Tiermodell für die Erforschung von Autoimmunerkrankungen, durchgeführt, um die Pathogenese des T1DM noch besser zu verstehen [55]. Bereits 1991 fanden Debray-Sachs et al. [56] heraus, dass die Blockade des Th1-spezifischen Zytokin IFN- $\gamma$  in diesen Mäusen T1DM verhinderte, während die Expression von IFN- $\gamma$  unter der Kontrolle des Humaninsulin-Promotors die Entwicklung von T1DM verursachen konnte [57]. Im Gegensatz dazu, zeigte Sobel et. al im Jahre 2002, dass die Gabe von IFN- $\gamma$  die Entwicklung von T1DM hemmte [58]. Die unterschiedlichen Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Autoimmunität nicht ausschließlich durch Th1-Zellen verursacht wird, sondern ebenso durch IL-17 produzierende Th17-Zellen. Es wurde nachgewiesen, dass IL-17 in der Pathogenese der T1DM eine Rolle spielt [59, 60], die Stilllegung der IL-17-Expression die NOD-Mäuse jedoch nicht vor T1DM schützte [61]. Zusammenfassend lässt sich mithilfe der murinen Untersuchungen sagen, dass die Produktion von IL-17 bei T1DM zwar hochreguliert ist, die Th17-Zellen für die Entwicklung des T1DM jedoch nicht notwendig sind [62, 63]. Es zeigt sich also



auch in den murinen Tierexperimenten, dass die Entstehung des T1DM einer hohen Komplexität unterliegt und es weiterer Forschung bedarf, vor allem an Gewebe, das nicht von Patienten bezogen werden kann. Nichtsdestotrotz wird die Relevanz der NOD-Mäuse diskutiert, da in der Vergangenheit durchgeführte Tierversuche nicht auf den Menschen übertragen werden konnten und die Ergebnisse sehr unterschiedlich waren [57, 64-66]

### **1.3. Zielsetzung und Fragestellung**

Da die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung des T1DM weiterhin kontrovers diskutiert wird und die Pathogenese unsicher ist, untersucht diese prospektive Querschnittsstudie die Reaktion und Polarisierbarkeit der peripheren T-Lymphozyten auf diabetesspezifische Antigene und auf *Candida albicans* bei erstmanifestierten Typ-1-Diabetikern (EM), länger-erkrankten Typ-1-Diabetikern (LS) und gesunden, altersentsprechenden Probanden (HD) und vergleicht diese miteinander. Es soll neben der Phänotypisierung und Polarisierbarkeit der peripheren T-Lymphozyten *in vitro*, bei einem Teil der Probanden auch deren Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand und die Th-spezifischen Transkriptionsfaktoren Tbet (Th1), FoxP3 (Th17) und RORc (Treg) analysiert werden. Die Analyse der Th1-, Th17- und Treg-Zellen sollen besonders im Fokus der Arbeit stehen, da zwar bereits bewiesen ist, dass diese in der Pathogenese des T1DM eine bedeutsame Rolle spielen [34, 67, 68], aber die Inselzell-Antigen-Spezifität dieser Zellen bisher noch nicht untersucht wurde. Die Fragestellung verfolgt einen explorativen Ansatz.

Aus diesem Grund werden die Ziele der Arbeit wie folgt definiert:

- Wie ist die Verteilung der Subpopulationen der T-Lymphozyten nach der Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* und gibt es Unterschiede zwischen den Kohorten (HD, EM, LS)?
- Welche Chemokinrezeptor-tragenden Zellen sind in den einzelnen Kohorten nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* vorhanden?

- Wie hoch ist die Expression von den Th-spezifischen Transkriptionsfaktoren Tbet (Th1), FoxP3 (Th17) und RORc (Treg) nach den Stimulationen und gibt es Unterschiede in den Kohorten?
- Gibt es Korrelationen zwischen der Expression der spezifischen Transkriptionsfaktoren und bestimmten Th-Subpopulationen?
- Welche und wie viele Zytokine werden von den stimulierten PBMCs produziert und gibt es Unterschiede zwischen den Kohorten (HD, EM, LS) und den verschiedenen Ansätzen?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Materialien**

Im Folgenden finden sich die tabellarischen Auflistungen der verwendeten Geräte und Materialien mit detaillierten Herstellerangaben. Außerdem sind am Ende die Softwares für die Auswertung angegeben.

#### **2.1.1. Geräte, Softwares und Verbrauchsmaterialien**

In Tabelle 3 sind die in dieser Dissertation verwendeten Geräte aufgelistet.

<b>GERÄT</b>	<b>HANDELSNAME</b>	<b>HERSTELLER</b>	<b>KATALOG NR./ PRODUKT NR.</b>
Pipetten	Easypet	Eppendorf AG, Hamburg, D	3033181
	Research plus 10ul	Eppendorf AG, Hamburg, D	492499Z
	Research plus 20 ul	Eppendorf AG, Hamburg, D	
	Research plus 100ul	Eppendorf AG, Hamburg, D	
	Research plus 200ul	Eppendorf AG, Hamburg, D	
	Research plus 1000ul	Eppendorf AG, Hamburg, D	493057Z
	Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, D	379067Z
	Integra PIPETBOY	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, D	494528Z
Laminar Flow Hood	Gelaire BSBS 6A	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, D	11031
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D	ZK13

<b>GERÄT</b>	<b>HANDELSNAME</b>	<b>HERSTELLER</b>	<b>KATALOG NR./ PRODUKT NR.</b>
Zentrifuge	Rotanta/K	Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D	3512
	Rotixa/P	Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D	4201
	Universal 32R	Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D	1610
Vortex	RetschMixer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D	
Inkubator	B 5060 EK-CO2	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D	19476
Wasserbad	GFL Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D	10549679
Waage	Sartorius	Denver Instrument, New York, USA	CP1245
Eiswürfelbereiter	AF 103	Scotsman Ice, Mailand	DL1157
Kühlschrank	Liebherr 4-8° C	Liebherr-International AG, Bulle, CH	1000831
	Liebherr Comfort -20° C	Liebherr-International AG, Bulle, CH	A24153
	Hera Freeze -80° C	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D	1013508
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	
NanoDrop	NanoDrop2000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA	E112352
Reverse Transkription	Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D	533102231
Real-Time PCR	ABI 7500	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	4349132

*Tabelle 3: Verwendete Geräte*

In dieser Tabelle 4 sind die Softwares für die Auswertung der Versuche angezeigt.

<b>SOFTWARE</b>	<b>BESCHREIBUNG UND VERSION</b>
Flowzytometrie	BD FACS Diva Software Version 6.1.3, Firmware Version 1.47 (BD FACSCanto II), BD Biosciences, Franklin Lakes, New York, USA
PCR-Auswertung	7500 Real-Time PCR Systems, Version 2.0.5, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Statistik	IBM SPSS Statistics Version 25, Armonk, New York, USA
Abbildungen	GraphPad Prism Version 5.0.4, San Diego, USA

*Tabelle 4: Softwares für die Auswertung*

In Tabelle 5 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

<b>VERBRAUCHS-MATERIALIEN</b>	<b>HANDELSNAME</b>	<b>HERSTELLER</b>	<b>KATALOG NR./ PRODUKT NR.</b>
Blutentnahmesystem	S-Monovette, NH4-Hep.	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	60334
	S-Monovette, 2,7ml K3E	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	6033411
	S-Monovette 4,7ml Z-Gel	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	6033911
	Safety-Multifly 21G, 200mm lang	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	6054311
	Cutasept F	BODE Chemie GmbH, Hamburg, D	385395
Einfrierröhrchen	Kryoröhrchen	VWR, Pennsylvania, USA	10018734
Einmalpipette	Serological Pipette 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	14080751
Reaktionsgefäße	SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	72.706
	SafeSeal 2ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	72.695
FACS-Tube	FACS Round-Bottom, Tubes 5ml	BD Biosciences, New Jersey, USA	352008

VERBRAUCHS-MATERIALIEN	HANDELSNAME	HERSTELLER	KATALOG NR./ PRODUKT NR.
Zentrifugenröhrchen	Cellstar, 15ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	188271
	Cellstar, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	227261
Gefrierbehälter	Cryo Freezing Container	Nalgene, New York, USA	51000001
Glaspipette	Cellstar, 10ml	Greiner Bio-One, GmbH, Frickenhausen, D	P7740
	Cellstar, 5ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	P7615
Handschuhe	Peha Nitril Handschuhe	P. Hartmann AG, Heidenheim, D	
Pipettenspitze	Biosphere Filter tips 10µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	70.760.210
	Biosphere Filter tips 100µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	70.760.212
	Biosphere Filter tips 1000µ	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	70.760.211
Abdeckfolie	Ampliseal, Transparente Microplatten Abdeckfolie 141,3/79,4mm	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D	676040
Kulturplatte	96-well cell culture plate, sterile, F-Bottom with lid	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D	655180
PCR- Platte	Saphire Microplatte,96 well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D	652290
PCR-Gefäße	Multiply – µStrip Pro 8er Kette, 200ul	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D	72.991.002

*Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für die Versuche*

### 2.1.2. Puffer, Medien und gebrauchsfertige Lösungen

In Tabelle 6 und Tabelle Tabelle 7 sind die in der Promotionsarbeit benötigten Puffer, Medien und gebrauchsfertigen Lösungen tabellarisch dargestellt.

<b>PUFFER UND MEDIEN</b>	<b>HANDELSNAME</b>	<b>HERSTELLER</b>	<b>KATALOG NR./PRODUKT NR.</b>
Puffer	Phosphate-Buffered-Saline Tablets (PBS)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA	18912-014
	Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA	A2058-1G
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D	A994.2
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA	E-5134
	CFSE	BioLegend, San Diego, USA	B181903
Medien	RPMI Medium	Lonza Group AG, Basel, Schweiz	BE12-702F
	x-vivo Medium	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA	BE02-060F
	FCS (Fetales Kälber Serum)	Carlsbad, USA	10270-106
	FBS Superior	Biochrom AG, Berlin, D	50615/0918B
	Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, D	A 2213
	FicoLite-H (Human)	Linaris, Dossenheim, D	GFF1511KYA
	1 % Penicillin-Streptomycin (100x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	A2213
β-Mercaptopurin			
Fertiglösung	Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D	19KE16GA
	Aqua ad iniectabilia (Aqua dest)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D	114558061
Ethanol	Ethanol 70 % vergällt mit circa 1 % MEK	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D	117256035
	Ethanol absolute, reag. ISO	Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA	SZBG0060V
Feststoff	Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA	39H013015
	Kaliumbicarbonat	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA	71K0121
	Natriumazid	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA	106H2540
	Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, D	288532
Propanol	2- Propanol	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA	33539-2-5L-R
SYBR-Green	iTaq Univeral, SYBR Green Supermix, 5ml	Bio-Rad Laboratories, Hercules USA	L001752 A

*Tabelle 6: Puffer und Medien*

<b>GEBRAUCHSFERTIGE LÖSUNGEN</b>	<b>ZUSAMMENSETZUNG</b>
Nährmedium T-Zellen	RPMI + 1 % PenStrep + 10 %FCS
Erythrozyten-Lysis-Buffer	8,26g NH <sub>4</sub> Cl, 1g KHCO <sub>3</sub> , 0,037g EDTA, gelöst in 1l Aqua destillata, pH 7,3
Einfriermedium	RPMI + 20 % FCS + 10 % DMSO
PBS	1 Tablette in 500 ml Auqa dest.
FACS-Puffer	0,5 % BSA + 0,01 % Natriumazid in PBS
Trypanblau	0,5 % Trypanblau in 50 ml PBS

*Tabelle 7: Gebrauchsfertige Lösungen*

### **2.1.3. Materialien für Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung**

In Tabelle 8 sind die für die Stimulation notwendigen Antigene dargestellt.

<b>ANTIGENE</b>	<b>HANDELSNAME</b>	<b>HERSTELLER</b>	<b>LOT. NR.</b>
GAD65	PepTivator GAD65 (human), 6nmol/peptide	MACS, Miltenyi Biotec, Auburn USA	130-096-769
Insulin (IAA)	PepTivator Insulin (human) 6nmol/peptide	MACS, Miltenyi Biotec, Auburn USA	130-096-771
Thyrosinphosphatase (IA2)	PepTivator IA-2 (human) 6nmol/peptide	MACS, Miltenyi Biotec, Auburn USA	130-097-275
Candida albicans	PepTivator Candida albicans MP65 (human) 6nmol/peptide	MACS, Miltenyi Biotec, Auburn USA	130-096-776

*Tabelle 8: Antigene für Zellstimulation*

Tabelle 9 zeigt die für die extrazelluläre Färbung der Oberflächenmarker benötigten Antikörper inklusive ihres Klons.

ANTIKÖRPER	FÄRBUNG	HERSTELLER	KLON	CAT. NR.	LOT- NR.
Zombie Aqua Dye		BioLegend, San Diego, USA			B223424
CD4	APC	BioLegend, San Diego, USA	OKT4	317418	B217365
CD161	APC	BioLegend, San Diego, USA	HP-3G10	339944	B200987
CD28	PeCy7	BioLegend, San Diego, USA	CD28.2	302926	B189875
CD25	PeCy7	BioLegend, San Diego, USA	BC96	302612	B231345
CCR6	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA	G034E3	353406	B205287
CD45RO	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA	UCHL1	304222	B193211
CD45RA	BV421	BioLegend, San Diego, USA	HI100	304130	B212116
CD4	BV421	BioLegend, San Diego, USA	OKT4	317434	B187127
CXCR3	PE	BioLegend, San Diego, USA	GO25H7	353708	B197483
CD8	PE	BioLegend, San Diego, USA	SK1	344706	B209311
CD8	APC-H7	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	SK1	560167	6140812
CCR5/CD195	APC-Cy7	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	G155-178	557751	4297808

*Tabelle 9: Antikörper für die extrazelluläre Färbung der Oberflächenmarker*

#### **2.1.4. Materialien für DNA/RNA Isolierung, Reverse Transkription und rtPCR**

In den drei nachfolgenden Tabellen sind die Substanzen und Kits, die für die Vorbereitung und die Durchführung der rtPCR-Messung notwendig sind, veranschaulicht. In Tabelle 10 sind die Materialien aufgelistet.



PRODUKT	HANDELSNAME	HERSTELLER	LOT. NR.
Reverse Transkription	Maxima Reverse Transkriptase 200U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	00495569
	RiboLock RNase Inhibitor 40U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	00316266
	dNTP Mix, 10mM 1ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	0027704
	Oligo(dT)18 Primer, 120µl,0,5µg/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	00535755
	5x RT Buffer, 1ml  RNA-freies H2O	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	00211286
SYBR-Green	iTaq Universal, SYBR Green Supermix,5ml	Bio-Rad Laboratories, Hercules USA	L001752 A

Tabelle 10: Materialien für Reverse Transkription

Tabelle 11 zeigt die Primer mit ihrem zugehörigen DNA-Abschnitt.

PRIMER	DNA-ABSCHNITT	HERSTELLER	LOT. NR.
FoxP3 Forward	5'TCA TCT GTG GCA TCA TCC GA-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	10-2232-3/6 H182
FoxP3 Reverse	5'GGA ACT CTG GGA ATG TGC TG-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	22-3463-1/11 H339
T-bet Forward	5'GTT CCC ATT CCT CTC ATT TAC TG-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	47-2047 19/300 H37440
T-bet Reverse	5'AGC ACA ATC ATC TGG GTC AC-3	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	47-2047 19/300H37440
RORc Forward	5'TTC TCA AAG CAG GAG CAA TGG-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	10-2232-5/6 H182
RORc Reverse	5'TGG GAG AAG TCA AAG ATG GAG-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	10-2232-6/6 H182
B2M Forward	5'CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	31-2094-7/8 H754
B2M Reverse	5'GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, D	31-2094-8/8 H754

Tabelle 11: Primer mit DNA-Abschnitt

In Tabelle 12 sind die gebrauchsfertigen Kits für die RNA- und DNA-Isolierung dargestellt.

KITS	HERSTELLER	CAT. NR.	LOT. NR.
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D	740955.250	1509/002
NucleoSpin RNA/DNA Buffer Set	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D	740944	1604/004

*Tabelle 12: Gebrauchsfertige Kits für RNA- und DNA-Isolierung*

### 2.1.5. Kit für die Zytokinmessung aus Überstand

In Tabelle 13 ist das Kit für die Zytokinmessung aus dem Überstand dargestellt.

KIT	HERSTELLER	CAT. NR.	LOT. NR.
FlowCytomix Multiple Analyte Detection, Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th 22 13plex Kit	eBioscience, Bender Med Systems GmbH	BMS817FF	6875005

*Tabelle 13: Kit für Zytokinmessung aus dem Überstand*

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Ethische Voraussetzungen

Vor der Untersuchung der Blutbestandteile von menschlichen Probanden, wurde der Antrag (Ethikvotum Nr. 239/10) zur Durchführung der Studie von der Ethik-Kommission bei der medizinischen Universität Würzburg bewilligt. Alle Probanden bzw. bei Minderjährigkeit deren Sorgeberechtigte, wurden in einem ausführlichen ärztlichen Gespräch und mithilfe eines Patienteninformationsblattes über die Studie und deren Inhalte aufgeklärt. Anschließend wurde die Einverständniserklärung unterschrieben und in Kopie an die Probanden ausgehändigt. Bei jedem Probanden wurde eine Blutentnahme inklusive Differentialblutbild durchgeführt. Außerdem wurden bei den erkrankten Probanden wichtige Informationen wie Zeitpunkt der Erstmanifestation, Höhe der Antikörpertiter, des C-Peptids und falls vorhanden, der zuletzt bestimmte HbA1c-Wert, bestimmt. Die Studie wurde nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki 2013 [69], den Prinzipien der Good Clinical Practice [70] und der Good Laboratory Practice durchgeführt.

### 2.2.2. Gesunde Kontrollprobanden (HD)

Die Vollblutproben konnten von immunologisch gesunden Kontrollprobanden (N=8) entnommen werden. Eine ausführliche Charakterisierung der gesunden Kontrollkohorte ist im Ergebnisteil (siehe Tabelle 21) dargestellt. Die Ein- und Ausschlusskriterien dieser Gruppe können der anschließenden Tabelle 14 entnommen werden.

---

#### Einschlusskriterien

- „Gesund“ entsprechend der WHO-Definition
- Routine-Blutabnahme ohne vorliegende Ausschlusskriterien

---

#### Ausschlusskriterien

- Maligne oder hämatologische Erkrankungen
- Impfungen innerhalb der vorausgehenden 4 Wochen vor Blutentnahme
- Schwere Infektionen innerhalb der letzten 3 Monate mit notwendigem Arztbesuch
- Schwere Allergien
- Autoimmunerkrankungen
- Patienten bei denen eine Transplantation durchgeführt wurde
- Patienten mit Kortison- und/oder immunsuppressiver Therapie
- Patienten mit monogenetisch determinierten Syndromen (bspw. DiGeorge-Syndrom, Down-Syndrom, u.a.)

---

*Tabelle 14: Ein- und Ausschlusskriterien der gesunden Kontroll-Probanden*

### 2.2.3. Diabetes mellitus Typ 1 Patienten (EM/LS)

Das Patientenkollektiv stellt sich aus erstmanifestierten (N=9) und langzeiterkrankten (N=12) T1DM Patienten zusammen. Entscheidend für die Zuteilung zu einer der beiden Gruppen ist die Krankheitsdauer. Lag die Erstmanifestation weniger als sechs Monate zurück, wurde der Proband der EM Kohorte zugeteilt, bei längerer Erkrankungsdauer der LS Kohorte. Die Vollblutabnahme für die Studie erfolgte im Zuge einer Routineblutentnahme. Da das Alter einen entscheidenden Einfluss auf die T-Zell-Polarisierbarkeit hat, wurde darauf geachtet, dass eine gleichmäßige Altersverteilung von Kontroll- und TDM1-Probanden vorliegt [71]. Die Patientengruppen werden auch im Ergebnisteil ausführlich charakterisiert und differenziert (siehe Tabelle 21). Die Ein- und Ausschlusskriterien der TDM1 Patienten sind in Tabelle 15 aufgelistet.

---

## Einschlusskriterien

- Diagnose Diabetes mellitus Typ 1

---

## Ausschlusskriterien

- Maligne oder hämatologische Erkrankungen
- Impfungen innerhalb der vorausgehenden 4 Wochen vor Blutentnahme
- Schwere Infektionen innerhalb der letzten 3 Monate mit notwendigem Arztbesuch
- Schwere Allergien
- Patienten bei denen eine Transplantation durchgeführt wurde
- Patienten mit Kortison- und/oder immunsuppressiver Therapie
- Patienten mit monogenetisch determinierten Syndromen (bspw. DiGeorge-Syndrom, Down-Syndrom, u.a.)

---

*Tabelle 15: Ein- und Ausschlusskriterien T1DM Patienten*

### **2.2.4. Lymphozytenisolierung mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation**

Für die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) wird die Dichtegradientenzentrifugation, die auf Dichteigenschaften von Ficoll beruht, verwendet. Die im Blut gelösten Makromoleküle werden anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft aufgetrennt. Da die Erythrozyten und Granulozyten eine größere Dichte als die Ficoll-Phase besitzen, passieren sie diese und sedimentieren zum Boden. Beschleunigt wird dieser Vorgang mittels der Agglutination dieser Zellen, die durch den hochpolymeren Zucker, Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer Ficoll, hervorgerufen wird. Die Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten platzieren sich an der Plasma-Gradientenphase oberhalb der Ficoll-Phase und unterhalb des Blutplasmas und können dort geerntet werden [72].

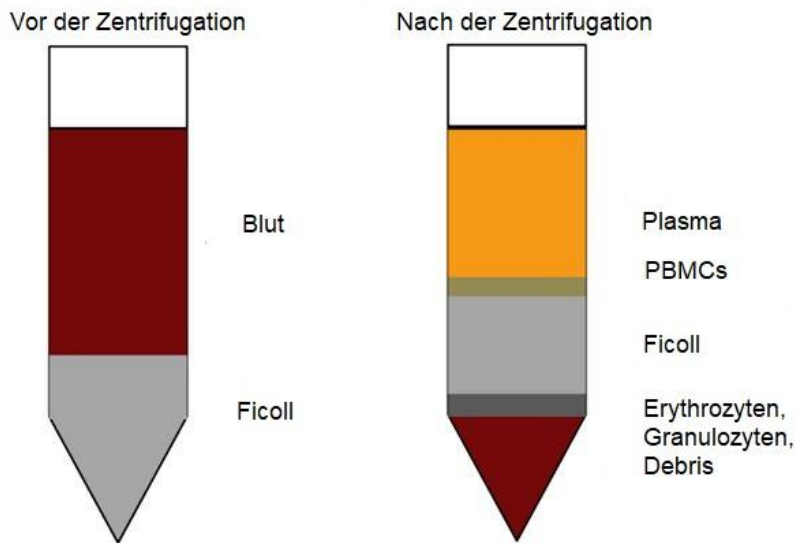


Abbildung 7: Falcon-Tube vor und nach der Zentrifugation. Links ist die Ficoll-Blut-Schichtung vor der Zentrifugation dargestellt. Rechts die mithilfe der Zentrifugation nach Dichte aufgetrennten Bestandteile des Blutes. Modifiziert nach [42]. Abkürzung: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Hierfür wird unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml Falcon Tube 10 ml Ficollmedium pipettiert und anschließend mit einer Einmalpipette vorsichtig 20 ml Probandenvollblut über die Ficoll-Phase geschichtet. Anschließend wird bei 1.700 Umdrehungen pro Minute (rpm) über 25 Minuten (min) ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend werden die ausgebildeten Schichten optisch erkannt und vorsichtig der PBMC-Ring mit einer Glaspipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Dieses wird mit 0,9 % NaCl aufgefüllt und erneut für 10 min mit 1.700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet mit 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. In diesem Schritt werden die übriggebliebenen Erythrozyten zerstört und somit eine Verunreinigung vermieden. Das Falcon Tube wird mit 10 ml Nährmedium (90 % RPMI, 10 % FCS) aufgefüllt und wieder 5 min mit 1.500 rpm zentrifugiert. Bevor die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt wird, wird der Überstand erneut abgesaugt und das Pellet mit 5 ml Nährmedium resuspendiert.

### 2.2.5. Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer

Diese Methode dient der lichtmikroskopischen Beurteilung der Vitalität der Zellen und Bestimmung der Zellzahl. Für die Bestimmung werden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau in ein Eppendorf AG Tube pipettiert und

mithilfe des Vortex-Schüttler gut vermischt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der nur avitale Zellen färbt, da er die Plasmamembran vitaler Zellen nicht passieren kann und hilft somit bei der Bestimmung der Vitalität [73]. Es werden 10 µl der Suspension auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert und eine Deckplatte daraufgelegt. Die Zählkammer besteht aus vier Großquadraten mit einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>. Unter mikroskopischer Beleuchtung werden zwei dieser Großquadrate ausgezählt. Im Anschluss wird mit folgender Formel die Zellzahl bestimmt:

$$\begin{aligned} & \text{Gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen (ml)} \\ & = \text{Totale Zellzahl der Probe} \end{aligned}$$

#### 2.2.6. Kryokonservierung

Damit die vorhandenen Zellen auch zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden können, werden diese zu je 5x10<sup>6</sup> Zellen pro ml mit Einfriermedium vorsichtig resuspendiert und anschließend für mindestens zwei Tage in Kryotubes mit Gesamtvolumen von 1 ml bei -80°C eingefroren. Das Einfriermedium setzt sich aus 70 % RPMI, 20 % FCS und 10 % DMSO zusammen. DMSO ist ein Gefrierschutzmittel, welches die Bildung von Eiskristallen beim Einfriervorgang minimiert. Es penetriert mithilfe seines geringeren Molekulargewichts die Zelle und kann intrazellulär bei niedrigeren Kühlraten mechanische Schäden verhindern [74]. Nachdem die Zellen bei -80°C wenige Tage gelagert wurden, werden sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff (zwischen -196°C und -210°C) überführt und dort langfristig gelagert. Da DMSO auch zytotoxische Effekte aufweist, wird sowohl vor dem Einfrieren als auch nach dem Auftauen der PBMCs darauf geachtet, dass die Zellen nur möglichst kurz dem flüssigen Einfriermedium ausgesetzt sind [75]. Hierfür wird eine definierte Anzahl an Zellen mithilfe einer -80°C Frosty-Box ausgefroren und im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend wird diese mit 10 ml erwärmtem Nährmedium resuspendiert und es wird die Lösung 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Um die Zellen vom toxischen DMSO zu isolieren, wird der Überstand abgesaugt und 5 ml PBS zu den Zellen pipettiert.

### 2.2.7. Antigenstimulation und In-vitro-Zellkultur

Da beim Ein- und Ausfrieren Zellen absterben können, werden diese vor Anlegung einer Zellkultur nochmals gezählt (siehe Kapitel 2.2.5.) und im Folgenden erneut 5 min mit 1.500 rpm zentrifugiert und 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml einer Lösung mit PBS und Carboxyfluoreszein-Succimidylester (CFSE) im Verhältnis von 2:1 (2 ml :1 ml) angefärbt und 4 min im Dunkeln stehen gelassen. CFSE ist ein fluoreszierendes Molekül. Wenn es im Zellinneren mit freien Aminen reagiert, kommt es zu stabilen Verbindungen und tritt somit nicht auf andere Zellen über. Sobald die Zelle sich teilt, wird dieses Molekül gleichmäßig auf die Mutter- und Tochter-Zelle verteilt, sodass anhand der Intensität der Fluoreszenz auf die Anzahl der Zellteilungen rückgeschlossen werden kann. Mithilfe des Durchflusszytometers (siehe Kapitel 2.2.8), werden somit proliferierende von nicht proliferierenden Zellen unterschieden [76-78]. Nachdem Färbeprozess werden die Zellen schnell mit 10 ml Nährmedium gewaschen (5 min, 1.500 rpm) und danach mit Nährmedium (Zusammensetzung: RPMI/7 % FCS) vermischt, sodass die Zellkonzentration im Anschluss  $5 \times 10^6$  Zellen/ml beträgt.

Um die Stimulation mit den richtigen Konzentrationen durchführen zu können (siehe Tabelle 16), müssen die Antigene zunächst mit Nährmedium verdünnt werden, damit die gewünschte Konzentration erreicht wird. Anschließend werden 100  $\mu$ l der Zellen in jeweils 6 Wells der 96-Well Platte pipettiert und danach 100  $\mu$ l der entsprechenden Antigene in jeweils eins der mit Zellen befüllten Wells auf der 96-Well Platte mit flachem Boden hinzugefügt (siehe Abbildung 9 und Abbildung 9). Die Stimulationszeit der Zellreihen im Inkubationsbrutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, mit Wasserstoff gesättigt), beträgt nach Etablierung der Versuche 7 Tage [78-81]. In einen der Ansätze wird kein Stimulus, sondern lediglich Nährmedium pipettiert. Ein anderer wird mit Phytohemagglutinin (PHA) stimuliert. PHA ist ein Lektinextrakt und hat eine hohe Affinität zu Lymphozytenoberflächenrezeptoren. Es regt die Zellteilungsaktivität der T-Lymphozyten an und dient somit als Positivkontrolle [82].

Substanz	Konzentration des Produkts	Verwendete Konzentration
PBMCs		5 x 10 <sup>6</sup> Zellen/ml
GAD65	50 µg/ml	5,0 µg/ml
IAA	50 µg/ml	0,5 µg/ml
IA2	50 µg/ml	5,0 µg/ml
Candida albicans	50 µg/ml	5,0 µg/ml
PHA	20 µg/ml	1,0 µg/ml

Tabelle 16: Konzentrationen der Antigene. Abkürzungen: Peripheral blood mononuclear cell (PBMC), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Thyrosinphosphatase (IA2), Phytohemagglutinin (PHA), Mikrogramm (µg), Milliliter (ml)

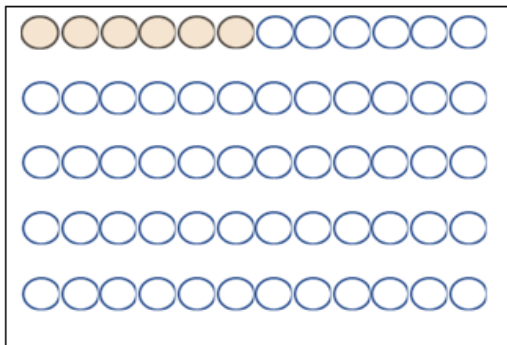


Abbildung 8: 96-Well Platte mit flachem Boden und den gefüllten Wells.

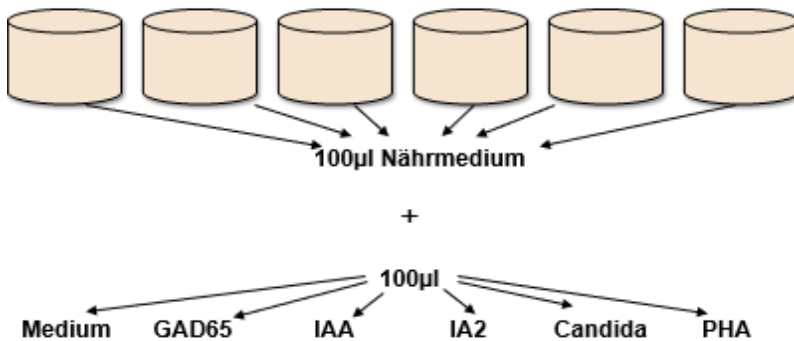


Abbildung 9: Beispielhaft für eine Versuchsreihe sind 6 gefüllte Wells mit einem unstimulierten Ansatz (Medium), den spezifischen Antigenen und PHA dargestellt. Abkürzungen: Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Thyrosinphosphatase (IA2), Candida albicans (Candida), Phytohemagglutinin (PHA)

### 2.2.8. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technologie, die gleichzeitig messen (Zytometrie = Zell-Vermessung) und verschiedene Analysen über physikalische Eigenschaften von einzelnen Partikeln (0,2-150 µm), oftmals Zellen, durchführen kann. Sie besteht aus drei Systemen: Flüssigkeitsstrom, Optik und Elektronik. Ersteres transportiert die Zellen in einem Strom zum Laserstrahl. Das optische



System besteht aus Lasern und durchleuchtet die Zellen, die im Flüssigkeitsstrom vorbeifließen. Je nach Eigenschaften der Zelle (Form, Struktur, Färbung) werden unterschiedliche Lichtsignale erzeugt, aus denen die Eigenschaften der Zelle eruiert werden können. Letzteres wandelt die erfassten Lichtsignale in elektronische Signale um, welche vom Computer verarbeitet werden können. Es können innerhalb eines kurzen Zeitintervalls viele Zellen analysiert werden (>1.000 Zellen/sec). Das Vorwärtsstreulicht (FSC: Forward Scatter) ist proportional zur Fläche oder Größe der Zelloberfläche der Zelle, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (SSC: Side Scatter) ein Maß für die innere Komplexität der Zelle, das heißt der Größe und Struktur ihres Zellkerns und die Menge der Vesikel. Das bedeutet, dass die Durchflusszytometrie zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterscheiden kann [83]. Hinzu kommt, dass mithilfe von fluoreszenzmarkierten Oberflächenmarkern, sogenannten Antikörpern, die gegen hochspezifische Zelloberflächenantigene (CD-Markern auf den Zellen) binden, eine qualitative und quantitative Bestimmung bestimmter Subpopulationen gemacht werden kann. Diese Methode wird Fluorescence activated cell sorting (FACS) genannt. Die Zellen werden mit verschiedenen Farbstoffen markiert und anschließend im Durchflusszytometer nach diesen Merkmalen sortiert. Die fluoreszenzmarkierten Einzelzellen werden durch drei verschiedene Laserstrahlen, beim FACS CANTO II der Firma BD Biosciences, geführt und die dabei emittierten unterschiedlichen Lichtsignale von 8 Photonendetektoren in elektronische Signale verwandelt [84, 85].

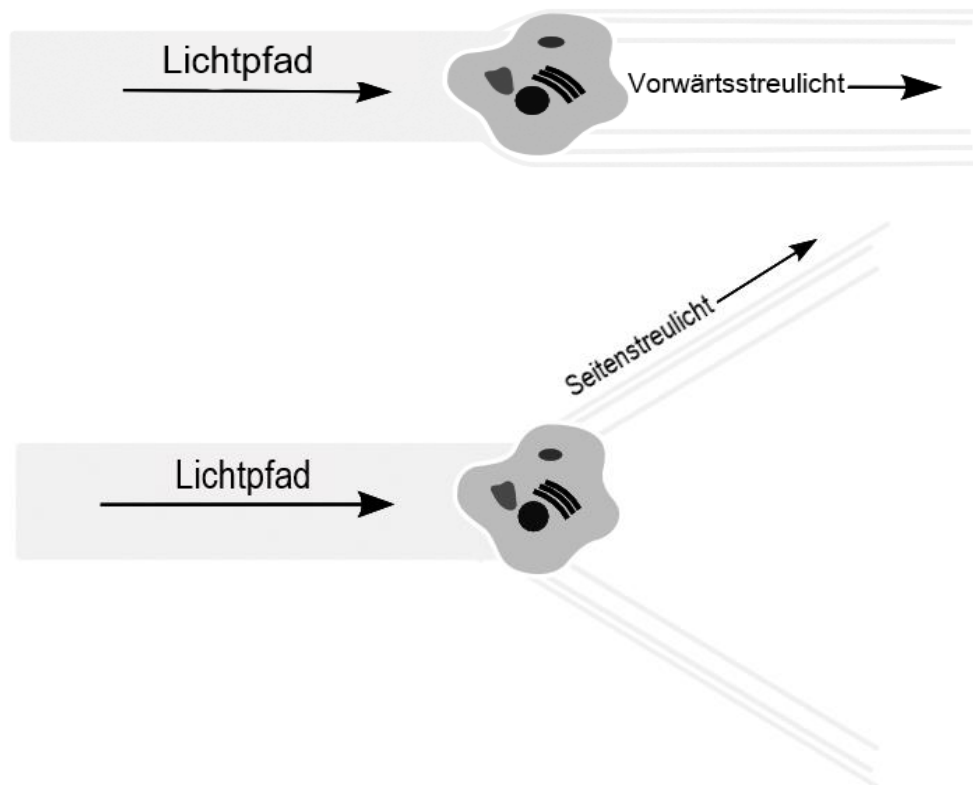


Abbildung 10: Vorwärtsstreuung (siehe oben) und Seitenstreuung (siehe unten). Modifiziert nach [86].

### 2.2.8.1. Extrazelluläre Fluoreszenzfärbung

Die Anfärbung verschiedener Oberflächenantigene, sogenannten Cluster of Differentiation (CD), dient der späteren Phänotypisierung mithilfe der Durchflusszytometrie. Unmittelbar vor dem Ablauf der Inkubationszeit der Zellkultur wird ein Färbepanel mit den verschiedenen Antigenen hergestellt. Der Mastermix besteht pro Well aus 50 µl PBS und entweder 0,6 µl oder 1 µl von jedem Farbstoff. Außerdem wird, um die toten Zellen detektieren zu können, pro Well eine Lösung aus 50 µl PBS und 0,1 µl Zombie hergestellt [87]. Es werden insgesamt zwei Mastermix benötigt, da mehr als acht Oberflächenantigene untersucht werden. Die hergestellten Mastermix werden bis zur endgültigen Färbung im Kühlschrank bei - 4°C gelagert.

Nun wird die Kulturplatte aus dem Inkubator geholt und die einzelnen Wells unter dem Lichtmikroskop auf Vitalität geprüft (siehe Abbildung 11 und 12). Die Zellen werden innerhalb ihres Wells resuspendiert und 120 µl in die zuvor beschrifteten DNA Tubes überführt. Die befüllten DNA Tubes werden in einer Zentrifuge mit

2.000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig pipettiert und wiederum in neue Tubes gebracht. Der Überstand wird zunächst eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt zur Zytokinproduktionsmessung wieder aufgetaut (siehe Kapitel 2.2.9). Die in den DNA Tubes verbliebenen Zellen, werden mit zuvor zubereiteten RA1 Buffer und dem Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptopurin (10 ml RA1 + 100  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptopurin) resuspendiert und im Folgenden bis zur DNA/RNA Messung im Kühlschrank bei - 20°C eingefroren.

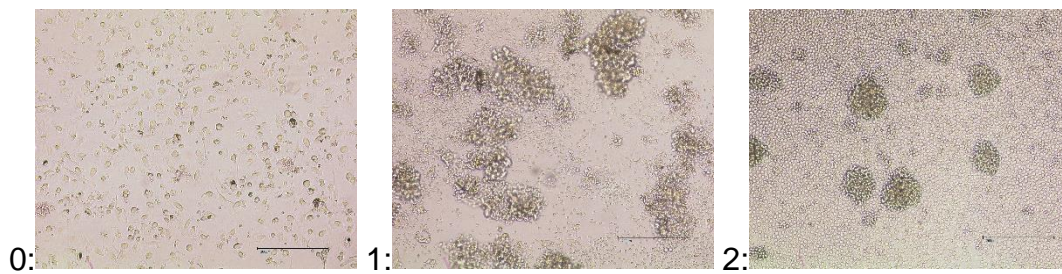


Abbildung 11: 10-fach vergrößerte mikroskopische Darstellung der Zellen (0: unstimuliert, 1: GAD65, 2: PHA)

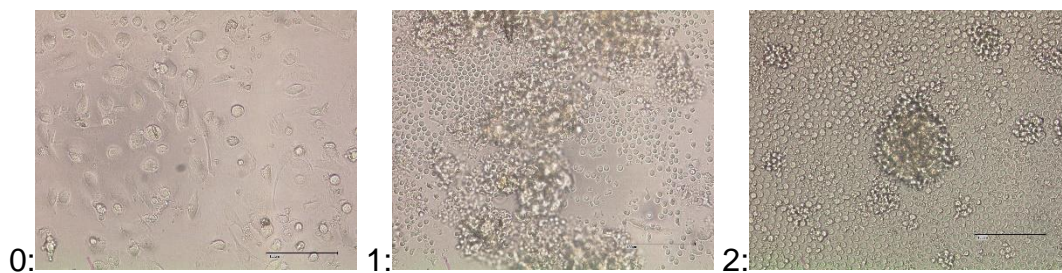


Abbildung 12: 20-fach vergrößerte mikroskopische Darstellung der Zellen (0: unstimuliert, 1: GAD65, 2: PHA)

Die in den Wells verbliebenen Zellen werden mit 100  $\mu$ l PBS suspendiert, sodass sich ungefähr 180  $\mu$ l Zellmedium in jedem Well befindet. Da wir zwei Färbepanel haben, werden jeweils 90  $\mu$ l in ein Falcon Tube pipettiert und im Anschluss mit 1 ml PBS gewaschen (1.500 rpm/5 min). Die Zellen werden nach abgebildetem Schema in 50  $\mu$ l Mastermix und 50  $\mu$ l Zombie resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Die Zellen werden nochmal mit 1 ml PBS gewaschen (1.500 rpm/5 min) und mit 200  $\mu$ l resuspendiert. Direkt im Anschluss werden sie mit dem FACS CANTO II Durchflusszytometer gemessen und mit der BD Software FACS DIVA ausgewertet. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, wurden zur Differenzierung der Th-Subpopulationen definierte und konstante Gates gewählt.

Farbstoff/Fluorochrome	Färbung 1	Färbung 2
	Oberflächenantigen	
APC	CD4	CD161
Pe-Cy7	CD28	CD25
PerCPCy 5.5	CCR6	CD45R0
BV421	CD45RA	CD4
PE	CXCR3	CD8
APC-H7	CD8	x
APC-Cy7	x	CCR5
Zombie	Zombie	Zombie

Tabelle 17: Extrazelluläre Färbung der Oberflächenantigene

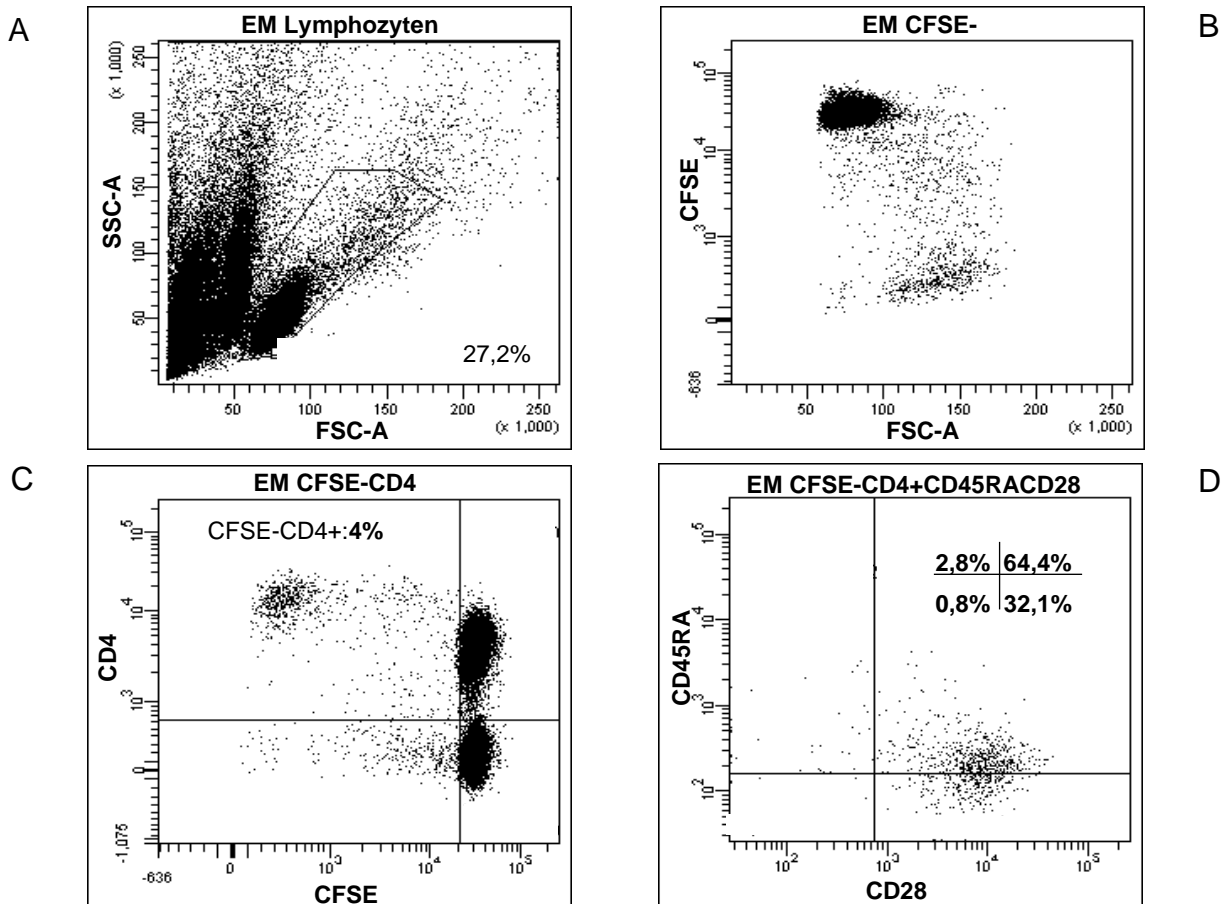


Abbildung 13: Beispiel für die Differenzierung der Th-Subpopulationen mithilfe der BD Software FACS DIVA und Erstellung von Gates. In Abbildung A werden die Lymphozyten isoliert, in B werden mithilfe von CFSE die proliferierenden Zellen dargestellt, C unterscheidet zwischen CFSE und CD4+ und CD4- Zellen und in D werden die CFSE-CD4+ Zellen mithilfe von CD45RA und CD28 in vier verschiedene Subpopulationen unterteilt. Die Prozente der einzelnen Subpopulationen geben den Anteil an CFSE-CD4+-Zellen an. Abkürzungen: Erstmanifestation (EM), Carboxyfluoreszein-Succimidylester (CFSE), Cluster of Differentiation (CD)

### 2.2.10. Zytokinproduktionsmessung mit FlowCytomix Pro3

Mit dem FlowCytomix Pro 3 Kit, können bis zu 13 verschiedene Zytokine schnell und gleichzeitig quantifiziert werden. Das von uns verwendete Kit legt die Konzentration auf die Zytokine, die besonders von Th1/Th2/Th9/Th17 und Th22 Zellen sekretiert werden. Das Prinzip dieser Messung liegt darin, dass antikörperbeladene Partikel der Probe hinzugefügt werden und diese die spezifischen Zytokine binden. Beim ersten Waschvorgang werden die mit Antikörpern beladenen Zytokine mit Biotin konjugiert, wohingegen der zweite Waschvorgang für die Konjugation mit Streptavidin-PE verantwortlich ist. Schlussendlich kann das Durchflusszytometer, nach dem gleichen Prinzip wie bei der Oberflächenantigenfärbung in Kapitel 2.2.8, die verschiedenen Zytokine anhand ihrer Größe und Fluoreszenzeigenschaften differenzieren. Die Auswertung erfolgt mit der FlowCytomix™ Pro Software, die die Konzentrationen der Zytokine berechnet [88]. Abbildung 14 zeigt das Prinzip der Zytokinmessung.

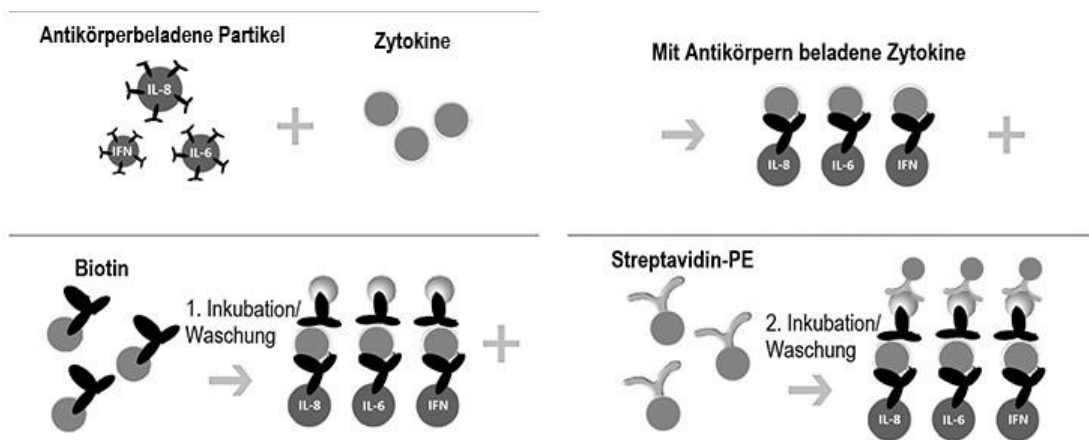


Abbildung 14: Prinzip der Zytokinmessung. Zuerst werden antikörperbeschichtete Zytokine mit der Probe inkubiert. Die Zytokine der Probe werden von den spezifischen Antikörpern erfasst. Anschließend werden spezifische biotinkonjugierte, gepaarte Antikörper hinzugefügt. Für deren Nachweis wird Streptavidin-PE zugesetzt. Mithilfe der Durchflusszytometrie und der FlowCytomix Pro Software werden die Analytenkonzentrationen bestimmt. Modifiziert nach [88]. Abkürzungen: Interleukin (IL), Interferon (IFN)

### 2.2.10.1. Messung und Analyse der Zytokinproduktion

Zunächst werden das FlowCytomix-Kit und die Serumproben ausgefroren und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Nun muss zuerst 50 ml des Assay Buffers (PBS mit 10 % BSA) mit 450 ml destilliertem Wasser verdünnt, vorsichtig gemischt und ebenfalls kühl gelagert werden. Danach wird eine Standardreihe von 1-7 erstellt und die Flaschen mit lyophilisierter Standardlösung vorbereitet. Dazu muss jede der 13 Flaschen mit einer bestimmten Menge destilliertem Wasser befüllt und geschwenkt werden, damit sich die Inhalte auflösen. Die resultierenden Konzentrationen der Standardlösungen sind in Tabelle 18: Übersicht der Konzentrationen der Standardlösungen. Im Anschluss wird die Lösung mindestens 10 min und maximal 30 min inkubiert. Damit die Standardlösung vor Anlegung der Standardreihe einen kurzen Impuls bekommt, wird jede Flasche 8 s zentrifugiert. Aus jeder Flasche wird 10 µl in das Standard Tube 1 pipettiert, sodass sich am Ende 130 µl im Tube befinden. Dieses wird nun mit 70 ml Assay Buffer auf 200 µl aufgefüllt. Die Standard Tubes 2-7 werden mit 100 µl Assay Buffer befüllt und anschließend werden immer 50 µl aus dem vorangehenden Standard in den nächsten Standard pipettiert und zwischendurch gut vermischt. Da wir zwei Standardreihen brauchen, wird das Vorgehen zweifach durchgeführt.

Standard	IFN- y	IL1- β	IL2	IL4	IL5	IL6	IL9	IL10	IL12	IL13	IL17 -A	IL22	TNF α
Konzentration in ng/ml	400	400	400	400	400	400	40	400	400	400	200	1600	400

*Tabelle 18: Übersicht der Konzentrationen der Standardlösungen der einzelnen Zytokine. Abkürzungen: Interleukin (IL), Interferon (IFN), Tumornekrosefaktor (TNF)*

Zur Herstellung des Bead-Mix werden die einzelnen Flaschen mit den Fluorescent Beads kurz zentrifugiert und jeweils 150 µl in ein davor beschriftetes Tube pipettiert. Das Tube wird mit Reagent Dilution Buffer (RDB) bis 3 ml aufgefüllt und bei 3.000 rpm 5 min zentrifugiert. Um eine Resuspension zu vermeiden, wird vorsichtig 2,95 ml von der Oberfläche entnommen und anschließend erneut 2,95 ml pipettiert und kurz gevortext.

Das Biotinkonjugat-Gemisch wird nach dem gleichen Schema hergestellt, nur dass 300 µl aus jeder Flasche pipettiert werden und ein finales Volumen von 6 ml entsteht.

Die Durchführung des Tests beginnt mit dem Waschen der Proben (1.600 rpm/5 min) und der Überführung des Serums in zuvor beschriftete FACS Tubes. Es werden 25 µl aus dem entsprechenden Standardmix 1-7 in die FACS Tubes 1-7 pipettiert. Anschließend werden 25 µl des Assay Buffers in alle Tubes und 25 µl jeder Probe in das vorhergesehene Tube gefüllt. Nun werden 25 µl Bead-Mix und 50 µl Biotin-Conjugate-Mix in alle Tubes pipettiert. Die Tubes werden vermischt und im Dunkeln bei RT 2 h inkubiert.

Währenddessen wird die Streptavidin-PE Lösung mithilfe von Assay Buffer hergestellt. Für die Anzahl an Tests werden insgesamt 197 µl Streptavidin-PE und 5933 µl Assay Buffer benötigt, sodass eine Lösung von 6130 µl entsteht.

Nach Abschluss der Inkubationszeit werden alle Tubes mit 1 ml PBS gewaschen (200 rpm/5 min) und der Überstand wird bis auf 100 µl vorsichtig abgenommen. Im Anschluss werden 50 µl Streptavidin-PE in jedes Tube pipettiert und die Lösung wird im Dunkeln bei RT 1 h inkubiert. Am Ende werden die Tubes noch zweimal mit jeweils 1 ml Assay Buffer (200 rpm/5 min) gewaschen und es werden abschließend 0,5 ml Assay Buffer in jedes Tube gefüllt. Beim Probentransport ist darauf zu achten, dass die Tubes vor Licht geschützt sind. Die Messung erfolgt mit dem FACS CANTO II Durchflusszytometer und die Auswertung mit der FlowCytomix™ Pro Software. Diese erstellt für jedes Zytokin Standardkurven im Bereich von 27-20.000 pg/ml. Die Konzentration der einzelnen Zytokine wird in pg/ml angegeben und die untere Nachweisgrenze liegt nach Angaben des Herstellers je nach Analyten bei 1,2-43,3 pg/ml. Alle Datenpunkte, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen, nehmen in der Auswertung den Betrag 0 an [89].

#### **2.2.11. DNA/RNA Isolierung**

Für die DNA/RNA Isolierung wird das NucleoSpin RNA- und NucleoSpin RNA/DNA- Buffer Set von Macherey-Nagel verwendet. Durch verschiedene Schritte werden bei Raumtemperatur zunächst die Zellen lysiert,

die RNasen inaktiviert und anschließend durch mehrere Waschvorgänge die DNA und RNA parallel aus einer ungeteilten Probe isoliert. Das genaue Vorgehen kann der Bedienungsanleitung von Macherey-Nagel entnommen werden [90, 91]. Nach der Isolierung wird mit dem NanoDropGerät die Reinheit der DNA und RNA gemessen. Als Trägersubstanz für die Messung dient RNase-freies Wasser.

### 2.2.12. Reverse Transkription

Da bei der im Abschnitt 2.2.12. beschriebenen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) spezifische Polymerasen, welche DNA-abhängig sind, zur Vervielfältigung der spezifischen Nukleinsäuresequenzen verwendet werden, ist nach der Isolierung zunächst die Transkription der RNA in cDNA notwendig. Analog zur PCR werden auch bei dieser Methode Primer und reverse Transkriptasen benötigt, um die DNA-Synthese durchzuführen. Die Substanzen, die zur Transkription benötigt werden, sind in Tabelle 19 aufgelistet. Aus all diesen Substanzen wird ein Mastermix hergestellt. Anschließend wird in jedes Tube 6,5 µl des Master-Mix', 12,5 µl der isolierten RNA und 1 µl der Maxima-RT pipettiert. Abschließend werden die Tubes in das Cycler-Programm gestellt und das Programm cDNAGIO (30 min 50 °C, 5 min 85°C, hold 4°C) gestartet. Nach der Transkription wird die cDNA bei - 80°C einzeln eingefroren. Transkription in cDNA mithilfe des Mastercycler von Eppendorff AG.

Substanz	Menge
RT-Buffer	4,0 µl
dNTP's (10mM)	1,0 µl
OligodT's 18 Primer	1,0 µl
RNase Inhibitor Ribolock RI	0,5 µl

Tabelle 19: Substanzen für die Reverse Transkription

### 2.2.13. Real-Time PCR

Bei einer PCR werden mithilfe einer Polymerase und spezifischen Primern gezielte DNA-Sequenzbereiche amplifiziert. Diese Primer besitzen einen zu den amplifizierenden DNA Sequenzen komplementären Aufbau. Durch diese selektive Anlagerung dienen sie der Polymerase als Start- und Endpunkt.



Die PCR beginnt mit einer 10-minütigen Denaturierungsphase um Sekundärstrukturen und gebildete Primerdimere durch Hitze aufzuschmelzen und die Polymerase zu aktivieren (95 °C). Darauf folgen 40 Zyklen, die in zwei Reaktionsschritte aufgeteilt werden können: Zunächst wird der zu amplifizierende Doppelstrang 15 s auf 95 °C erhitzt und somit in Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend lagern sich die Primer als Startmoleküle an das 3'-Ende der DNA. In diesem Schritt findet in einer Minute bei 60 °C die Synthese der zu amplifizierenden DNA statt. Durch jeden Zyklus wird die spezifische DNA Sequenz verdoppelt.

Die von uns verwendete quantitative Real-Time PCR (qPCR) dient zur Quantifizierung eines bestimmten Genabschnitts. Die Menge des entstandenen Produkts wird in Form von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit (Real-Time) gemessen. Die emittierte Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des exprimierten Genabschnitts zu. Je höher die anfängliche Kopienzahl des zu bestimmenden Gens, desto früher steigt die Fluoreszenz an und somit können Rückschlüsse auf die ursprüngliche Anzahl an Kopien des amplifizierten Abschnittes gezogen werden. Der für die Entstehung des Fluoreszenzsignals zuständige Farbstoff ist SYBR Green, der an doppelsträngige DNA bindet. Um äußere Einflussfaktoren zu eliminieren und die Varianz der Expressionsergebnisse zu reduzieren, wird für jede Probe parallel zum untersuchenden Genabschnitt zusätzlich die Expression von  $\beta$ -2-Mikroglobulin (B2M) gemessen. B2M ist ein Haushaltsgen, das unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Außerdem wird für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert bestimmt. Zur relativen Quantifizierung der Expression des zu untersuchenden Gens dient folgende Formel [92]:

$$\Delta CT = \text{Mittelwert CT Zielgen} - \text{Mittelwert CT des Haushaltsgen}$$

Zur Durchführung des qPCR Versuchs wird eine kalte PCR-Platte benötigt, da durch niedrige Temperaturen verhindert werden soll, dass die cDNA bereits während des Pipettierens exprimiert wird. In jedes Well werden sowohl die spezifische cDNA, Forward- und Reverse-Primer des untersuchenden

Genabschnitts, RNase-freies Wasser und SYBR Green pipettiert (siehe Tabelle 20). Wichtig ist, dass für jeden Versuchsansatz eine Doublet gebildet wird, damit eine Doppelbestimmung durchgeführt werden kann.

Das finale Volumen pro Well sollte 10 µl betragen. Anschließend wird die fertige Platte mit einer Folie abgeklebt. Die Messeinstellungen am ABI 7500 Fast Real Time PCR System von Applied Biosystems sollten wie folgt aussehen:

- 1. Stage: 95 Grad 10 min (1 Zyklus)
- 2. Stage: 95 Grad 15 s  
60 Grad 1 min (40 Zyklen)
- 3. Stage: 95 Grad 15 s  
60 Grad 1 min  
95 Grad 15 s (1 Zyklus)

Substanz	Menge
SYBR Green	5,0 µl
Forward Primer 10µM	0,4 µl
Reverse Primer 10µM	0,4 µl
cDNA 1:10 verdünnt	4,0 µl
RNase-freies Wasser	0,2 µl

Tabelle 20: Substanzen für die qPCR

### 2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach ausführlicher Beratung von Viktoria Rücker, die im Institut für Epidemiologie und Biometrie an der Julius-Maximilians-Universität für medizinische Doktorarbeiten zuständig ist, und mit Hilfe der Analyse-Software IBM SPSS Statistics Version 25. Die Grafiken wurden mit GraphPad Prism Version 5.04 erstellt.

Die Kreuztabellen zur Darstellung von Zusammenhängen und zum Vergleich der Häufigkeitsverteilung wurden mit deskriptiven Statistiken erstellt.

Aufgrund der Probenanzahl war eine Normverteilung nicht anzunehmen (Kolmogorov-Smirnov-Test). Deshalb erfolgte die Auswertung zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden bei nicht-parametrisch verteilten Daten bei zwei unabhängigen Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test. Bei der

Charakterisierung der Kohorten wurde bei mehreren unabhängigen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Bei beiden Tests werden die Messwerte rangiert und Rangsummen gebildet, die zur Berechnung der Teststatistik verwendet werden. Auf Grund des explorativen Ansatzes der Arbeit wurde eine Korrektur auf Multiples Testen nicht durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde zur Orientierung bei  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Verteilung dichotomer Variablen wurden mit dem Chi-Square- bzw. mit dem Fisher's Exacta Test bei  $N < 60$ , wie in unserem Fall, berechnet.

Die Korrelationsanalyse wurde nach Spearman durchgeführt. Hier findet auch eine Rangierung der Daten statt und es wird der Korrelationskoeffizient  $r$  berechnet.  $r$  kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ist er  $> 0$ , besteht ein positiver linearer Zusammenhang. Ist der Wert  $< 1$ , besteht ein negativer linearer Zusammenhang. Bei einem Wert  $r = 0$ , besteht kein Zusammenhang der Variablen. Nach Cohen (1988) besteht eine geringe Korrelation bei  $r$  Werten zwischen 0,1-0,3, eine mittlere Korrelation zwischen 0,3-0,49 und eine hohe bei  $r$  Werten  $> 0,5$ . Wird der Korrelationskoeffizient  $r$  quadriert ergibt sich das Bestimmtheitsmass  $r^2$ .

### **3. Ergebnisse**

Die Ergebnisse lassen sich in eine Beschreibung der Kohorte und in vier Teile mit verschiedenen Schwerpunkten der Laboranalyse untergliedern.

In Kapitel 3.1. werden die verschiedenen Kohorten charakterisiert. Kapitel 3.2 und 3.3 befassen sich mit dem Vergleich der Phänotypisierung der stimulierten Zellen zwischen den drei Kohorten. Im Anschluss werden in Kapitel 3.4 die Polarisierbarkeit der Transkriptionsfaktoren und ihre Korrelationen zu verschiedenen Th-Subpopulationen dargestellt. Und im letzten Kapitel 0 wird die Zytokinproduktion der stimulierten PBMCs beschrieben.

#### **3.1. Charakterisierung der Kohorten HD, EM und LS**

In Tabelle 21 sind die demographischen Eigenschaften der HD, EM und LS dargestellt. Die gesamte Studienpopulation setzt sich aus 28 Probanden

zusammen. Von diesen sind 14 Probanden männlich und 14 weiblich. Während bei den EM der mehrheitliche Teil weiblich ist, ist bei den LS die Mehrheit männlich. Zwischen den drei Kohorten gibt es jedoch keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf das Geschlecht ( $p=0,632$ ).

Das durchschnittliche Alter der gesamten Studienpopulation betrug zum Zeitpunkt der Messung 27,7 Jahre. Auch hier unterscheiden sich die Kohorten nicht signifikant voneinander ( $p=0,147$ ). Die jüngste Population waren die EM (Mittelwert 21,8 Jahre), es folgten die HD (26,4 Jahre) und die älteste Gruppe stellten die LS dar (32,8 Jahre).

Das Alter der EM und LS bei der Erstmanifestation unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant voneinander. Während die LS im Durchschnitt 19,5 Jahre alt sind, sind die EM 21,8 Jahre alt. ( $p=0,862$ ).

Da die Einteilung der Patienten in EM und LS anhand der Krankheitsdauer festgelegt wurde, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Krankheitsdauer der EM und der LS. Während die EM im Durchschnitt nur 0,48 Monate erkrankt waren, waren die LS bereits 158,4 Monate erkrankt ( $p=0,0001$ ).

	HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=12)		p-Wert
<b>Geschlecht</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	
<b>Weiblich</b>	3	42,9	6	66,6	5	42,0	0,632
<b>männlich</b>	4	57,1	3	33,3	7	58,0	
	<b>Mittelwert ± SD</b>	<b>Median; Min-Max</b>	<b>Mittelwert ± SD</b>	<b>Median; Min-Max</b>	<b>Mittelwert ± SD</b>	<b>Median; Min-Max</b>	
<b>Alter bei Messung (Jahre)</b>	26,4 ± 8,2	24,0, 21,0-45,0	21,8 ± 13,9	20,0; 7,0-46,0	32,8 ± 13,0	35,0, 5,9-48,0	0,147
<b>Alter bei EM (Jahre)</b>			21,3 ± 13,4	19,8; 6,9-44,3	19,5 ± 11,0	18,5-38,0	0,862
<b>Krankheits- dauer (Monate)</b>			0,48 ± 0,48	0,24; 0,12-1,68	158,4 ± 132,0	114,0, 15,0-360,0	0,001

*Tabelle 21: Deskriptive Charakterisierung der Kohorten HD, EM und LS. Der p-Wert der Altersunterschiede bei Messung wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und der p-Wert der Altersunterschiede bei EM und der Krankheitsdauer mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Unterschiede zwischen der dichotom verteilten Variable Geschlecht wurde mit dem Fisher's Exacta Test berechnet. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestationen (EM), Langzeiterkrankte (LS), Standardabweichung (SD), Minimum (Min), Maximum (Max), Anzahl (N)*

Die diabetesspezifischen Antikörper sind heutzutage wichtig bei der Diagnosestellung des T1DM. Da der Zeitpunkt der Erstmanifestation, vor allem bei den LS, schon länger zurückliegt, routinemäßig nicht alle Antikörper abgenommen werden und nicht bei allen Patienten alle Antikörper nachweisbar sind, stimmt die Anzahl der positiv gemessenen Antikörper, wie in Tabelle 22 ersichtlich, nicht mit der Anzahl der erkrankten Probanden überein. Die nicht dargestellten Werte der Antikörpertiter waren teilweise negativ, nicht dokumentiert oder wurden bei einem anderen Teil routinemäßig nicht abgenommen. Tabelle 22 zeigt außerdem die Konzentration des C-Peptids zum Zeitpunkt der Erstmanifestation und den HbA1c zum Zeitpunkt der Messung. Während sich die C-Peptidwerte nicht signifikant unterscheiden, ist der HbA1c der LS signifikant kleiner als der der EM ( $p=0,012$ ). Ergänzt wird die Tabelle mit dem BMI und anderen Erkrankungen der T1DM Patienten. Diese Eigenschaften sind für die detaillierte Charakterisierung wichtig.

Alle gesunden Probanden wiesen zum Messzeitpunkt keine weiteren Erkrankungen auf.

	EM (N=9)			LS (N=12)			p-Wert
	N	%	Median; Min-Max	N	%	Median; Min-Max	
<b>GAD65-Ak</b> in U/ml	4	44,4	48,4; 1,6-110,0	4	33,3	5,3; 1,6-21,0	0,200
<b>ICA-AK</b> in Titer	3	33,3	1:20; 1:10-80	3	25,0	1:10; 1:10-40	0,629
<b>IA2-AK</b> in U/ml	3	33,0	11,0; 7,5-36,0	2	16,7	100,0; 11,0-189,0	0,400
<b>C-Peptid</b> in ng/ml	4	44,0	1,5; 0,6-1,8	4	33,3	0,6; 0,3-1,3	0,200
<b>HbA1c</b> in mmol/mol	8	88,8	87,4; 69,4-156,8	11	91,7	61,8; 43,2-172,1	<b>0,012</b>
<b>BMI</b> in kg/m <sup>2</sup>	2	22,2	19,5; 19,0-20,0	6	50,0	25,7; 23,0-40,0	0,071
<b>Sonstige Autoimmunerkrankungen</b>	4	50,0		2	16,7		
- Hashimoto Thyreoiditis	2	25		1	8,3		
- Vitiligo	1	12,5		0	0		
- Morbus Basedow	1	12,5		0	0		
- Hypoparathyreoidismus	1	12,5		0	0		
- PET 2	0	0		1	8,3		

Tabelle 22: Eigenschaften der T1DM Kohorten EM und LS. Die p-Werte der diabetesspezifischen Antigene, des C-Peptid, des HbA1c und des BMI wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Der Cut-off Wert der ICA liegt bei einem Titer von <1:10. Abkürzungen: Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Minimum (Min), Maximum (Max), Anzahl (N) Glutamat-Decarboxylase (GAD), Inselzellantikörper (ICA), Thyrosinphosphatase (IA2), Polyglanduläre Endokrinopathie Typ 2 (PET 2)

Patienten-Nummer	Geschlecht	Alter bei Blutabnahme	Erstmanifestation	Dauer der Erkrankung	Positiver Antikörper-Nachweis	HbA1c zum Zeitpunkt der Blutabnahme
EM	m/w	Jahre	Alter in Jahren	in Jahren	Art	mmol/mol
1	w	34	34	0	GAD65, ICA, IA2	78,0
2	w	10	10	0	ICA	69,4
3	w	9	9	0	ICA	82,5
4	w	35	35	0	GAD65, ICA, IA2	93,0
5	m	12	12	0	Keine	70,5
6	w	7	7	0	Nicht dokumentiert	92,3
7	m	46	46	0	Nicht dokumentiert	156,8
8	w	20	20	0	GAD65, IA2	149,1
9	m	23	23	0	GAD65	Nicht dokumentiert
LS						
1	m	36	31	5	Keine	61,8
2	m	47	20	27	Nicht dokumentiert	53,0
3	w	23	5	18	Nicht dokumentiert	49,7
4	w	28	26	2	GAD65, ICA, IA2	43,2
5	w	40	19	21	GAD65, ICA	63,0
6	m	21	15	6	Nicht dokumentiert	57,0
7	w	35	24	11	GAD65	66,0
8	m	45	15	30	Nicht dokumentiert	Nicht dokumentiert
9	m	9	7	2	ICA	172,1
10	m	17	15	2	GAD65, IA2	115,3
11	w	45	17	28	Nicht verfügbar	62,8

Tabelle 23: Darstellung der Eigenschaften der einzelnen T1DM Patienten EM und LS. Das Alter, der Zeitpunkt der Erstmanifestation und die Dauer der Erkrankung sind in Jahren dargestellt und der HbA1c in mmol/mol. Bei einzelnen Patienten waren die Antikörpertiter nicht verfügbar. Abkürzungen: Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), männlich (m), weiblich (w), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Inselzellantikörper (ICA), Thyrosinphosphatase (IA2)

In Tabelle 23 sind die Eigenschaften der einzelnen T1DM Patienten innerhalb der Kohorten aufgelistet. Es zeigt sich, dass es sowohl bei EM als auch bei LS Patienten mit mehreren positiven Antikörpern gab, als auch Patienten, von denen die Antikörpertiter nicht gemessen wurden oder nicht zur Verfügung standen. Auch die HbA1c-Werte und das Erkrankungsalter weisen eine hohe Variabilität innerhalb der Kohorten auf.

Die Differentialblutbilder zeigen, im Hinblick auf die Anzahl der Leukozyten (Einheit in 1000/nl) und die prozentuale Verteilung (%) der Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen keine signifikanten Unterschiede. Es gab jedoch sowohl zwischen einzelnen Probanden, als auch zwischen den Gruppen größere Unterschiede. Wie in Tabelle 24 sichtbar, war sowohl die absolute Leukozytenzahl, als auch der prozentuale Neutrophilenanteil bei den LS größer als bei den anderen beiden Kohorten. Im Gegensatz dazu, war der prozentuale Anteil der Lymphozyten kleiner. Die Monozyten, Eosinophilen und Basophilen sind in allen drei Kohorten annähernd gleich. Probanden, deren Differentialblutbild auf einen Infekt hinwies, wurden vor der statistischen Auswertung aussortiert (N=1).

	HD (N=7)		EM (N=8)		LS (N=11)		p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	
<b>Leukozyten</b> in 1000/nl	5,7 ± 1,5	5,7; 3,7-8,4	6,8 ± 2,2	7,0; 2,8-9,3	7,9 ± 1,8	8,6; 5,3-10,1	0,068
<b>Neutrophile</b> in %	52,9 ± 9,0	52,3; 41,8-64,3	55,0 ± 12,0	56,6; 34,0-72,3	62,0 ± 8,0	65,1; 44,9-72,4	0,095
<b>Lympho- zyten</b> in %	35,2 ± 8,9	35,9; 24,8-46,8	33,0 ± 12,4	33,2; 14,0-54,7	25,8 ± 8,7	25,0; 17,2-45,2	0,154
<b>Monozyten</b> in %	6,1 ± 0,84	6,2; 5,1-7,3	7,1 ± 1,6	7,2; 4,8-9,7	6,3 ± 3,0	5,7; 3,4-13,6	0,173
<b>Eosinophile</b> in %	2,7 ± 0,83	2,6; 1,4-4,1	2,4 ± 1,9	2,0; 0,10-6,0	3,1 ± 2,7	1,8; 1,0-8,2	0,500
<b>Basophile</b> in %	0,84 ± 0,96	0,5; 0,3-3,0	0,83 ± 0,25	0,85; 0,50-1,2	0,82 ± 0,27	0,9; 0,40-1,2	0,177

Tabelle 24: Mittelwerte der verschiedenen Zellen im Differentialblutbild. Die Leukozytenzahlen sind absolute Werte, während die anderen Zellen in % von den Leukozyten angegeben sind. Die p-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Minimum (Min), Maximum (Max), Anzahl (N), Nanoliter (nl)

### **3.2. Polarisierbarkeit der Th-Subpopulationen in HD, EM und LS**

Im folgenden Kapitel wird dargestellt, wie die mit diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* stimulierten PBMCs proliferiert haben. Die proliferierten CFSE-reduzierten (CFSE-) T-Zellen werden zunächst anhand ihrer Oberflächenmarker in CD4+- (Kapitel 0) und CD8+-T-Zellen (Kapitel 3.2.2) unterteilt. Die proliferierten Zellen werden in dieser Dissertation in den Abbildungen als CFSE- Zellen beschrieben. Die CD4+- und CD8+-T-Zellen werden anschließend in Naive, TEMRA, Gedächtnis, Effektor, regulatorische T-Zellen und Th17-Zellen differenziert und somit die Polarisierbarkeit der PBMCs nach verschiedenen Stimulationen untersucht. Die Auswertung beruht auf den Oberflächenmarkern CD4, CD8, CD45RA, CD28, CD25 und CD161. Da zur Analyse der Zellproliferation der Farbstoff CFSE verwendet wurde, wurde auf eine intrazelluläre Färbung verzichtet. Mithilfe des Proliferationsmarkers CFSE, wurden nur die proliferierten Zellen in die Analysen einbezogen. Die Methode der Zellfraktionierung- und Differenzierung mithilfe der BD Software FACS DIVA wurde in Kapitel 2.2.8 beschrieben und ist exemplarisch in Abbildung 15, 16 und 17 dargestellt.



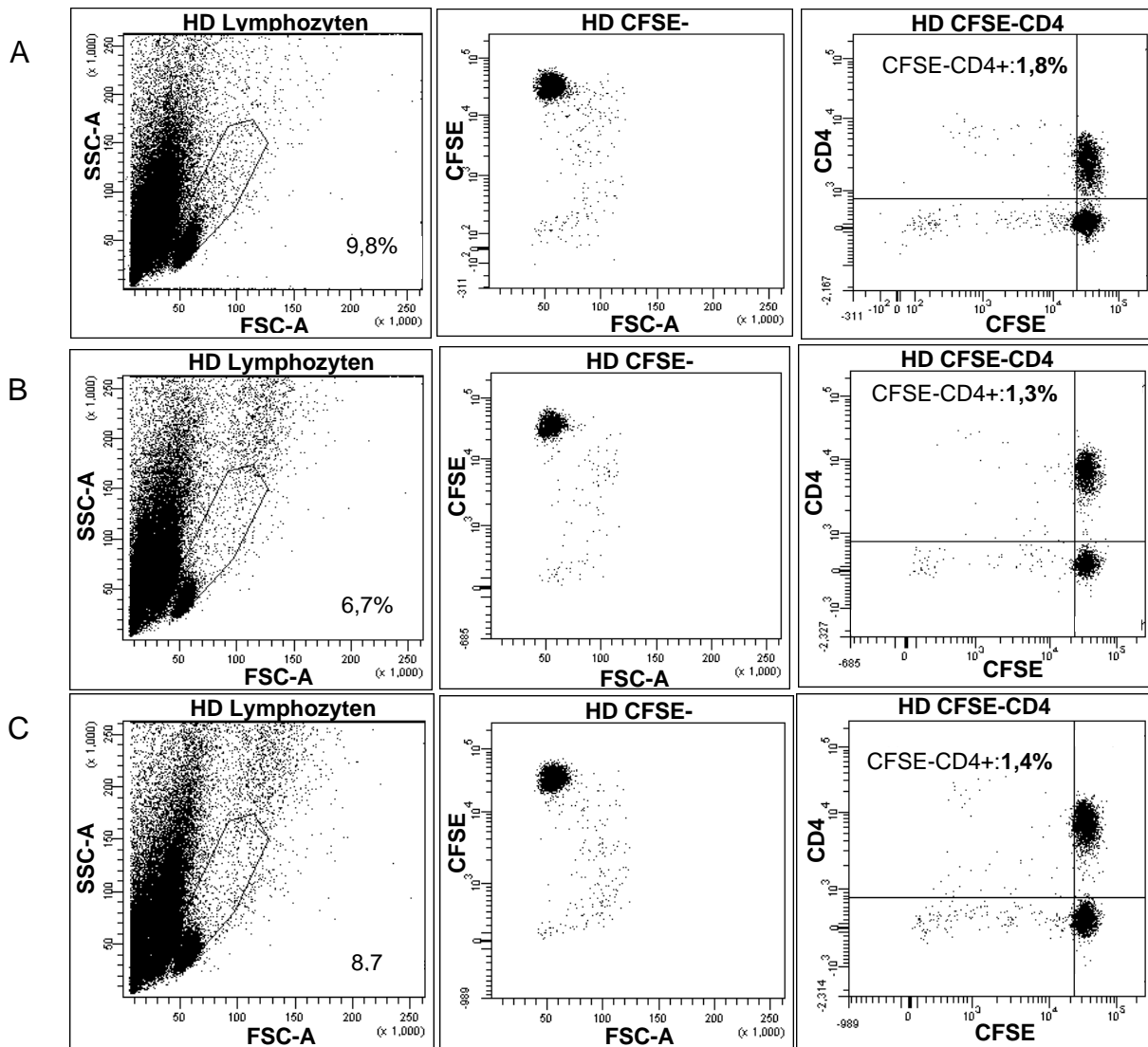


Abbildung 15: Repräsentative Darstellung der Differenzierung der proliferierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten aus den PBMCs in Kultur bei einem Gesunden im unstimulierten Ansatz (A), nach Stimulation mit GAD65 (B) und *Candida albicans* (C). Die dritte Spalte zeigt die proliferierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Prozent von den Lymphozyten an. Abkürzung: Gesunde (HD), Carboxyfluoreszein-Succimidylester (CFSE), Cluster of Differentiation (CD)

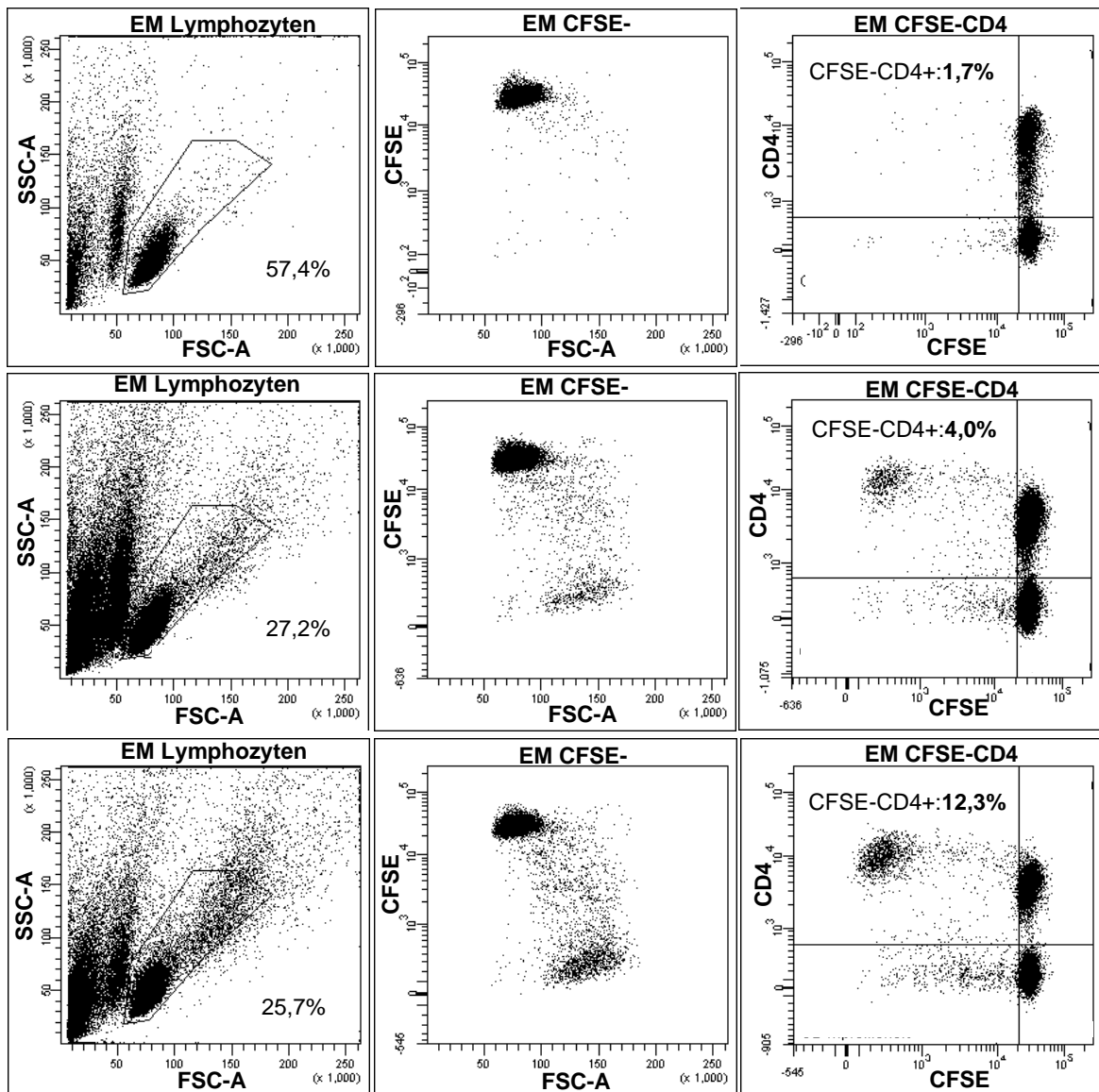


Abbildung 16: Repräsentative Darstellung der Differenzierung der proliferierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten aus den PBMCs in Kultur bei einem Erstmanifestierten im unstimulierten Ansatz (A), nach Stimulation mit GAD65 (B) und *Candida albicans* (C). Die dritte Spalte zeigt die proliferierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Prozent von den Lymphozyten an. Abkürzung: Erstmanifestation (EM), Carboxyfluoreszein-Succimidylester (CFSE), Cluster of Differentiation (CD)

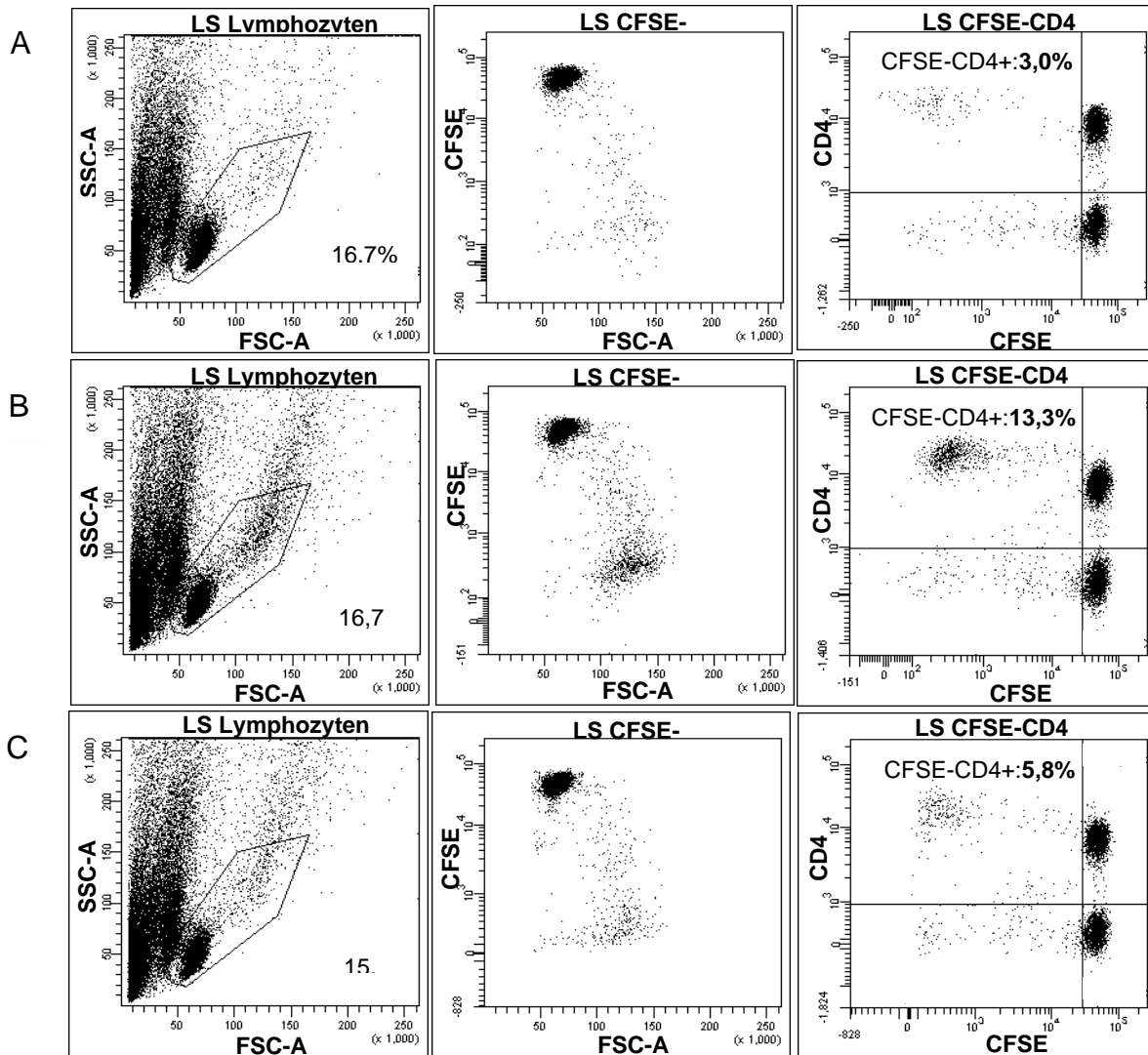


Abbildung 17: Repräsentative Darstellung der Differenzierung der proliferierten CD4+-Lymphozyten aus den PBMCs in Kultur bei einem Langzeiterkrankten im unstimulierten Ansatz (A), nach Stimulation mit GAD65 (B) und *Candida albicans* (C). Die dritte Spalte zeigt die proliferierten CD4+-T-Zellen in Prozent von den Lymphozyten an. Abkürzung: Langzeiterkrankte (LS), Carboxyfluoreszein-Succimidylester (CFSE), Cluster of Differentiation (CD)

### 3.2.1. CD4-positive Th-Subpopulationen

Der Vergleich der Mittelwerte der proliferierten CD4+-T-Zellen in den einzelnen Kohorten ergibt deutliche Unterschiede. Abbildung 18 und Tabelle 25 zeigen graphisch und konkret anhand von Zahlen, dass bereits im unstimulierten Ansatz EM mehr als dreimal so viele CD4+-T-Zellen als HD und mehr als zweimal so viele wie LS aufweisen. Auch nach Stimulation mit GAD65, IAA und *Candida albicans* zeigen sich bei EM durchschnittlich deutlich höhere Werte als bei HD und LS. Die Unterschiede sind beim unstimulierten Ansatz ( $p=0,029$ ) und nach

der Stimulation mit *Candida albicans* ( $p=0,023$ ) zwischen EM und HD signifikant. Alle anderen Ansätze weisen keine Signifikanz auf.

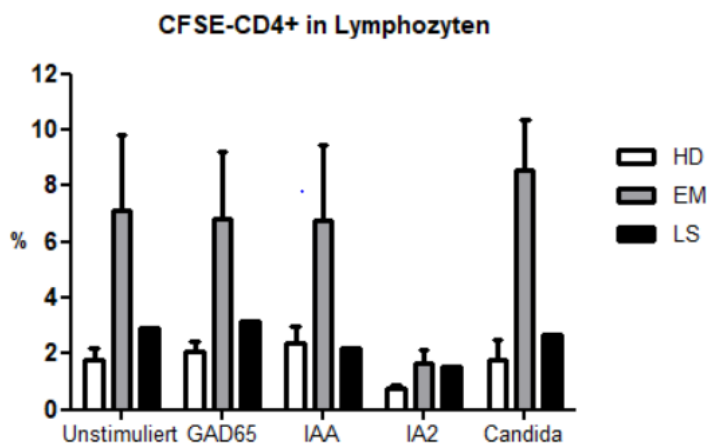


Abbildung 18: Anteil der proliferierten CD4+-T-Zellen an den Lymphozyten in Kultur. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Ansätze der verschiedenen Gruppen HD (weiß), EM (grau), LS (schwarz) dargestellt. Die y-Achse zeigt die % der proliferierten CD4+-T-Zellen in den Lymphozyten mit Standardabweichung des Mittelwertes. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Thyrosinphosphatase (IA2)

% CFSE-CD4+ in Lymphozyten	HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=11)		p-Wert		
	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
Unstimuliert	1,8 ± 1,1	1,8; 0,1-3,4	7,1 ± 7,7	3,4; 1,7-24	2,9 ± 2,7	2,7; 0,2-8,2	<b>0,029</b>	0,246	0,310
GAD65	2,1 ± 0,9	2,1; 1,3-3,8	6,8 ± 7,3	4,3; 1,3-23,6	3,2 ± 3,9	2,0; 0,5-13,3	0,071	0,813	0,053
IAA	2,4 ± 1,5	2,7; 0,5-5,1	6,8 ± 8,1	3,0; 1,6-23,0	2,2 ± 1,5	1,7; 0,4-5,1	0,210	0,724	0,112
IA2	0,8 ± 0,3	0,8; 0,4-1,1	1,7 ± 1,4	1,1; 0,2-3,5	1,6 ± 1,6	0,6; 0,2-3,9	0,491	0,950	0,959
Candida albicans	1,8 ± 1,8	1,0; 0,3-4,4	8,6 ± 5,4	3,5; 1,4-27,9	2,6 ± 2,2	0,9; 0,6-5,8	<b>0,023</b>	0,328	0,370

Tabelle 25: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der proliferierten CD4+-T-Zellen in den Lymphozyten in Kultur bei HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 7 nur 6). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Thyrosinphosphatase (IA2) Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

Bei genauerer Betrachtung der Werte der einzelnen Probanden, wird deutlich, dass es in allen Gruppen große interindividuelle Unterschiede gibt. Wie in Abbildung 19 zu sehen, gibt es in allen Kohorten einzelne Ausreißer, die besonders stark proliferiert haben. Die Abbildung zeigt außerdem, dass die Anzahl der EM, die stärker auf die Antigene reagiert haben, höher ist als bei den anderen Kohorten LS und HD. Während bei HD keiner der Probanden

mehr als 5 % an proliferierten CD4+-T-Zellen aufweist, haben außer nach Stimulation mit IA2 immer mindestens zwei bis vier Probanden der EM und mindestens ein Proband der LS mehr als 5 % an proliferierten CD4+-T-Zellen. Nach Stimulation mit IA2 zeigen sich auch deutlich höhere Werte bei EM und LS als bei HD, auch wenn der durchschnittliche prozentuale Anteil niedriger liegt als bei den anderen Stimulationen.

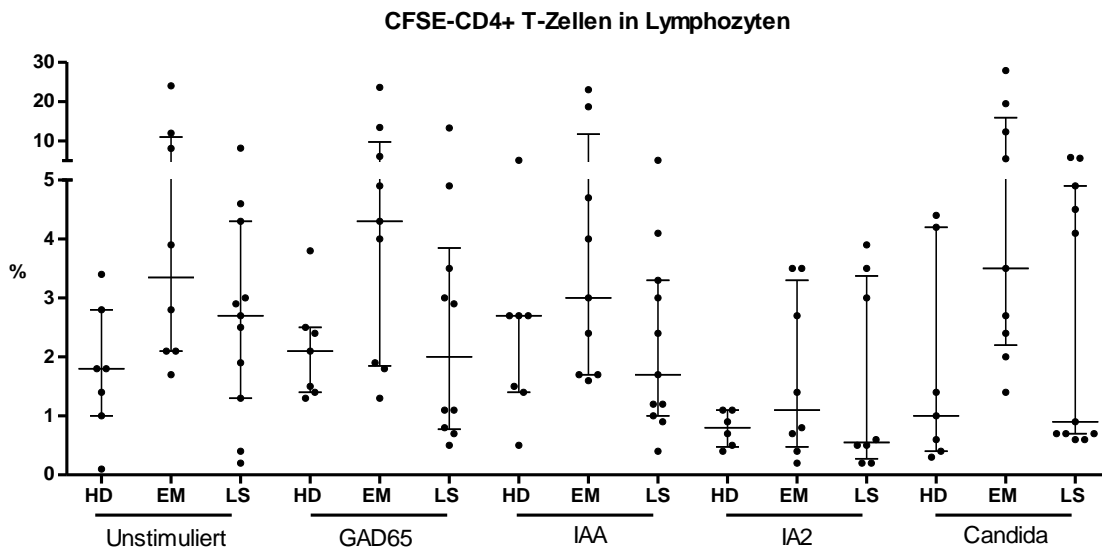


Abbildung 19: Proliferierte CD4+-T-Zellen in Lymphozyten in Kultur. Auf der x-Achse sind die HD, EM und LS in den verschiedenen Ansätzen aufgeführt. Die y-Achse zeigt die Prozent der proliferierten CD4+-T-Zellen an den Lymphozyten der einzelnen Patienten inklusive der Mediane und der Interquartilsabstände. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

Um die deskriptiven Daten zu ergänzen, wurde eine Ratio zwischen den proliferierten CD4+-T-Zellen der als Positivkontrolle dienenden Stimulation mit PHA und dem jeweils spezifischen Stimulus gebildet.

$$\text{Ratio CFSE-CD4+} = (\text{CFSE-CD4+ Stimulus} / \text{CFSE-CD4+ PHA}) * 100$$

Tabelle 26 zeigt die Daten der Analyse der Ratio bei den verschiedenen Antigenen in den Kohorten HD, EM und LS. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen HD, EM und LS.

Ratio Stimulus /PHA	HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=11)		p-Wert		
	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
Unstimuliert	5,5 ± 3,1	5,4; 0,3-10,0	14,7 ± 13,3	7,7; 4,2-40,2	9,5 ± 7,9	8,4; 0,6-28,4	0,121	0,179	0,492
GAD65	7,3 ± 4,0	7,5; 3,2-13,3	14,3 ± 9,8	14,1; 2,7-32,1	9,4 ± 10,7	6,3; 1,3-37,2	0,174	0,831	0,182
IAA	7,8 ± 5,4	8,1; 1,5-18,2	13,2 ± 11,0	10,6; 3,2-31,3	6,7 ± 4,4	5,5; 1,0-14,3	0,351	0,659	0,175
IA2	2,4 ± 1,1	2,2; 0,9-3,9	3,7 ± 3,1	2,9; 0,7-9,9	5,8 ± 6,8	1,9; 0,5-18,9	0,662	1,00	0,959
Candida albicans	7,0 ± 8,6	3,6; 0,7-22,7	18,1 ± 15,5	12,9; 2,9-43,3	8,9 ± 8,7	2,4; 1,5-25,8	0,091	0,479	0,112

Tabelle 26: Durchschnittliche Ratio der proliferierten CD4+-T-Zellen nach Stimulation mit PHA und einem anderen Stimulus in HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte zwischen jeweils zwei Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 7 nur 6). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

Außerdem wird, zusätzlich zu dieser quantitativen Analyse, noch eine qualitative Analyse angeschlossen, indem ein willkürlicher Cut-off der Ratio von 15 % festgelegt wird. Alle Ratiowerte, die wenigstens 15 % erreichen, haben positiv auf den Stimulus reagiert und alle kleiner 15 % haben nach dieser willkürlichen Definition nicht reagiert. Mithilfe von Abbildung 20 lässt sich erkennen, dass nach Stimulation mit GAD65 kein HD, jedoch vier EM (EM2, EM5, EM6 und EM9) und ein LS (LS1) eine positive Proliferation aufweisen. Nach Stimulation mit IAA zeigt ein HD (HD6) eine positive Proliferation genauso wie zwei EM (EM2 und EM6). Nach Stimulation mit IA2 weist lediglich LS2 eine positive Proliferation auf. Die meisten Probanden reagieren nach Stimulation mit Candida albicans mit einer positiven Proliferation. Zwei HD (HD1 und HD 7), drei EM (EM1, EM2 und EM6) und drei LS (LS1, LS2 und LS3). Außerdem ist zu erwähnen, dass drei EM (EM 2, EM5 und EM6) und ein LS (LS10) auch im unstimulierten Ansatz eine positive Proliferation aufweisen. Bei allen anderen Probanden erreicht die Ratio nicht den Cut-off von 15 %. Die Patienten-Nummern der Abbildung 20 stimmen mit den Angaben der deskriptiven Daten in Tabelle 23 überein. Sowohl die Daten in Tabelle 23 als auch die visuelle Darstellung der Abbildung 20 zeigen, dass es große interindividuelle Unterschiede innerhalb der Kohorten gibt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass keine Korrelationen zwischen Antikörpertiter, HbA1c-Wert, Dauer der Erkrankung und der positiven Proliferation der CFSE-CD4+-T-Zellen innerhalb der individuellen Patienten bestehen.

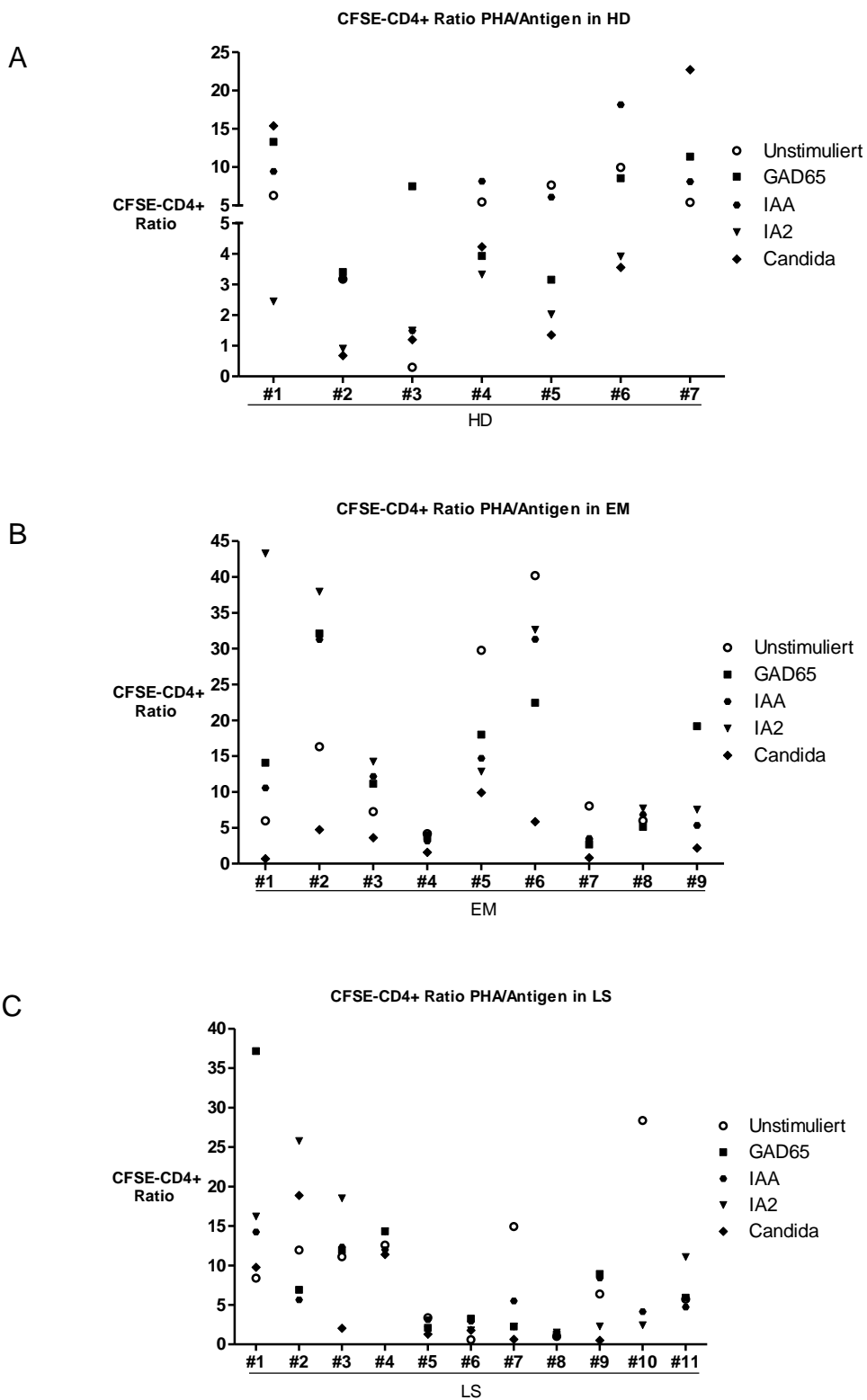


Abbildung 20: Ratio der proliferierten CD4+-T-Zellen nach Stimulation mit PHA und einem anderen Stimulus. Die verschiedenen Ansätze sind unterschiedlichen Symbolen zugeordnet. Abbildung A zeigt die einzelnen Probanden der HD, Abbildung B die einzelnen Probanden der EM und Abbildung C die einzelnen Probanden der LS. Die Zahlen unterhalb der x-Achse stehen für die individuellen Probanden innerhalb der Kohorten. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

Nach Betrachtung der proliferierten CD4+-T-Zellen, folgt die Analyse der proportionalen Verteilung der CD4+-Th-Subpopulationen. Da die Zellen mit CFSE gefärbt wurden, wurde auf eine weitere intrazelluläre Färbung verzichtet, um Interferenzen der Lichtemission zu vermeiden. Abbildung 21 zeigt repräsentativ die Differenzierung der Th-Subpopulationen mithilfe der BD Software FACS DIVA.

In Tabelle 27 sind die naiven T-Zellen (CD45RA+CD28+), die Gedächtniszellen (CD45RA-CD28+), die T-Effektorzellen (CD45RA-CD28-) und die TEMRA (CD45RA+CD28-) aufgelistet. Die Summe der Mittelwerte dieser vier Subpopulationen ergibt 100 %. Außerdem zeigt die Tabelle die Tregs (CD25+) und die Th17-Zellen (CD161+). Die Mittelwerte sind in Prozent von proliferierten CD4+-T-Zellen angegeben. Und die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Anhand der Tabelle 27 ist zu erkennen, dass sich die proportionale Verteilung der Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen verschiebt.

Während die Mittelwerte der naiven T-Zellen im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit IA2 bei den EM größer sind als bei HD und LS, sind diese nach Stimulation mit *Candida albicans* kleiner als in den anderen beiden Kohorten



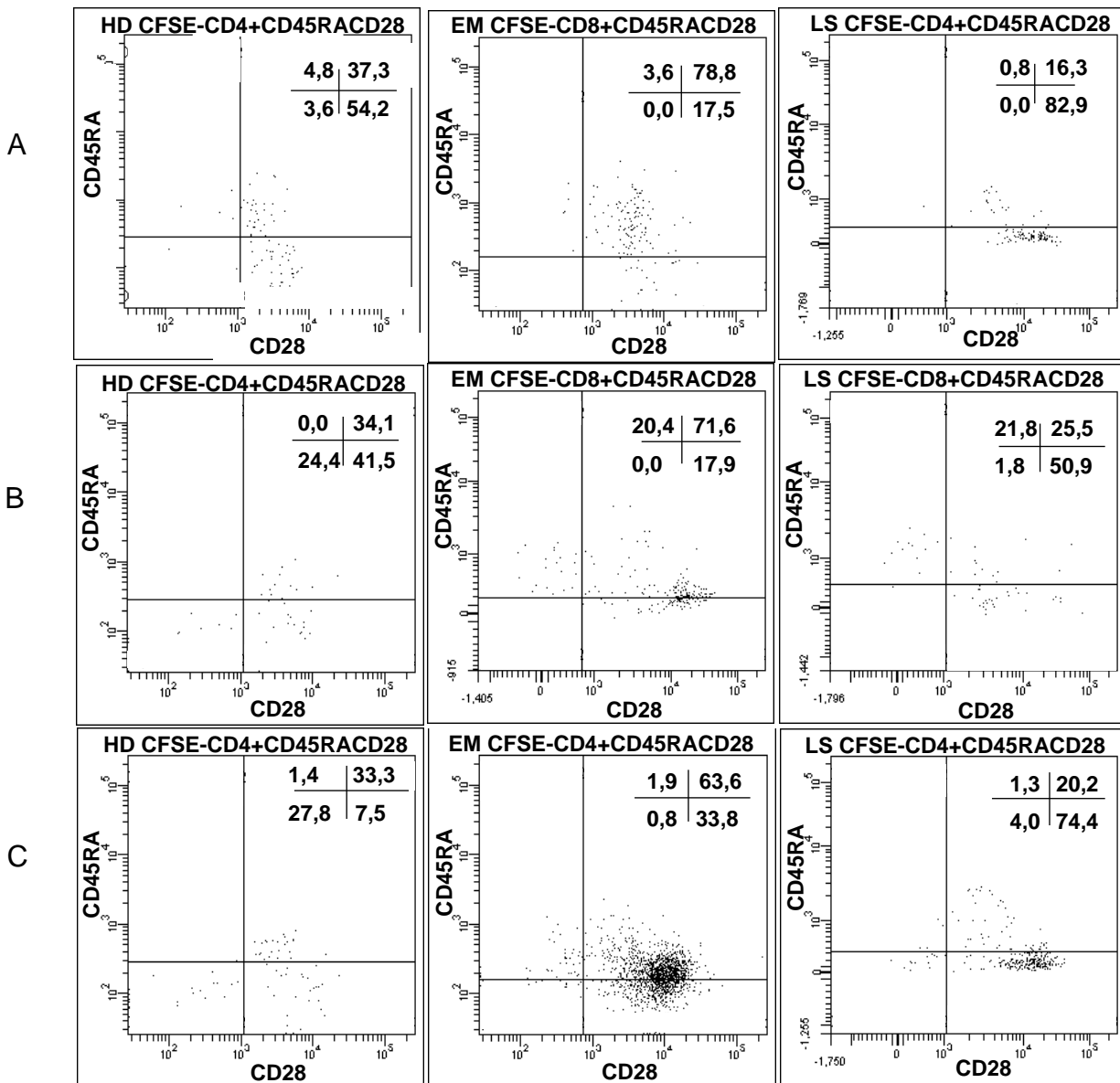


Abbildung 21: Repräsentative Darstellung der naiven T-Zellen (CD45RA+CD28+), der Gedächtniszellen (CD45RA-CD28+), der T-Effektorzellen (CD45RA-CD28-) und der TEMRA (CD45RA+CD28-) in den CFSE-CD4+-T-Zellen im unstimulierten Ansatz (A), nach Stimulation mit GAD65 (B) und *Candida albicans* (C). Die Zahlen sind in Prozent von den CFSE-CD4+ Zellen in den einzelnen Quadranten angegeben. In Spalte 1 ist ein HD, in Spalte 2 ein EM und in Spalte 3 ein LS exemplarisch dargestellt. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD)

Nach Stimulation mit GAD65 und IAA liegen kaum Unterschiede zwischen den Kohorten vor. Signifikante Unterschiede gibt es in keinem der Ansätze.

Die Proportionen der Gedächtniszellen bleiben nach den Stimulationen annähernd gleich. Die EM zeigen nach Stimulation mit IA2 deutlich weniger Gedächtniszellen als in den anderen Ansätzen, ebenso wie die LS nach

Stimulation mit *Candida albicans*. Im Vergleich zwischen den Kohorten gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Die T-Effektorzellen weisen mit durchschnittlichen proportionalen Anteilen von minimal 2,3 bis maximal 16,7 große Unterschiede in den Ansätzen und den Kohorten auf. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz, verdoppeln sich die Mediane der T-Effektorzellen der EM nach Stimulation mit IAA und GAD65 fast, während die Mediane von HD und LS in diesen Ansätzen beinahe gleichbleiben. Nach Stimulation mit IA2 und *Candida albicans*, zeigt sich in allen drei Kohorten, außer bei LS nach Stimulation mit *Candida albicans*, größere Werte der Mediane und Mittelwerte im Vergleich zum unstimulierten Ansatz. Es gibt wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten.

Die TEMRA sind die kleinste Subpopulation der CD4+-T-Zellen. Der maximale durchschnittliche Wert dieser Subpopulation wird von den LS nach Stimulation mit IAA erreicht. Dieser Wert ist signifikant höher als der Wert der HD nach Stimulation mit IAA ( $p=0,046$ ). Außerdem sind die Mediane nach allen Antigenen, außer bei LS nach Stimulation mit *Candida albicans*, kleiner als im unstimulierten Ansatz. Die Werte der Kohorten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Auch die Tregs zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Während im unstimulierten Ansatz durchschnittlich die meisten Tregs in der HD Kohorte zu finden sind, ist in den Stimulationsansätzen der größte Anteil der Tregs in der EM Kohorte. Die LS haben im Hinblick auf die Mediane und Mittelwerte die wenigsten Tregs.

Während der durchschnittliche prozentuale Anteil der Th17-Zellen bei den HD nur nach Stimulation mit IA2 höher ist als im unstimulierten Ansatz, lassen sich die Th17-Zellen der EM polarisieren, da sie in allen Stimulationsansätzen durchschnittlich mehr Th17-Zellen aufweisen als im unstimulierten Ansatz. Außerdem haben die LS signifikant mehr Th17-Zellen nach Stimulation mit GAD65 als die HD ( $p=0,043$ ).

% von CFSE-CD4+-Zellen		HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=11)		p-Wert		
		Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
<b>Naive</b> CD45RA+ CD28+	Unstimuliert	24,5 ± 12,1	29,1; 7,9-38,7	36,2 ± 24,5	29,7; 7,4-78,8	29,8 ± 22,6	20,7; 2,7-60,0	0,463	0,860	0,395
	GAD65	25,8 ± 7,6	25,4; 14,3-36,6	27,1 ± 17,9	26,2; 6,2-64,4	23,3 ± 12,7	28,9; 7,6-42,7	1,000	0,887	0,780
	IAA	23,9 ± 14,5	21,4; 6,7-48,0	22,6 ± 12,8	16,4; 10,7-44,0	23,2 ± 14,4	20,0; 9,3-50,8	0,918	0,930	0,941
	IA2	34,3 ± 14,6	35,3; 16,7-50,0	45,0 ± 19,5	46,5; 16,4-66,7	33,7 ± 21,4	27,8; 8,3-74,8	0,414	1,000	0,328
	Candida	32,3 ± 12,8	32,3; 15,4-50,0	24,8 ± 16,1	24,0; 10,3-63,6	33,9 ± 20,0	31,0; 5,7-67,1	0,142	1,000	0,261
<b>Gedächtnis</b> CD45RA- CD28+	Unstimuliert	65,8 ± 12,0	63,9; 51,9-85,7	59,3 ± 24,8	65,4; 17,5-87,4	55,5 ± 23,7	50,0; 16,8-87,8	0,867	0,425	0,778
	GAD65	64,8 ± 13,0	70,0; 41,5-78,9	60,8 ± 25,3	65,6; 24,5-92,4	60,0 ± 19,1	61,3; 33,3-89,2	1,000	0,475	0,905
	IAA	68,1 ± 16,6	67,5; 44,1-88,9	67,4 ± 17,3	75,7; 43,6-87,2	62,4 ± 19,6	66,1; 22,6-86,5	0,918	0,596	0,656
	IA2	54,1 ± 14,5	51,2; 34,9-75,0	41,3 ± 22,4	33,7; 14,3-75,2	56,0 ± 18,0	57,7; 21,7-76,5	0,181	0,662	0,195
	Candida	54,8 ± 19,1	50,0; 29,4-84,6	57,3 ± 23,2	60,5; 14,5-88,3	44,8 ± 19,2	45,0; 17,8-74,4	0,758	0,285	0,175
<b>Effektor</b> CD45RA- CD28-	Unstimuliert	6,0 ± 7,8	3,6; 0,0-21,5	2,3 ± 2,4	2,6; 0,0-6,7	9,8 ± 13,6	6,0; 0,0-44,4	0,463	0,659	0,177
	GAD65	7,0 ± 7,8	4,5; 1,7-24,4	9,3 ± 11,6	4,9; 0,7-36,7	11,7 ± 14,9	4,9; 1,4-46,0	0,918	0,740	0,604
	IAA	5,4 ± 3,2	4,6; 0,8-10,6	8,4 ± 10,9	4,6; 0,2-36,4	7,3 ± 6,5	5,1; 0,0-22,5	0,918	0,596	0,824
	IA2	11,1 ± 9,6	12,9; 0,0-22,2	12,0 ± 14,9	5,9; 0,0-41,2	9,8 ± 7,4	8,1; 2,0-18,8	0,950	1,000	1,000
	Candida	11,8 ± 12,2	8,0; 0,0-27,8	14,4 ± 18,2	6,0; 0,8-52,7	16,7 ± 16,1	10,0; 0,0-53,3	0,758	0,425	0,503
<b>TEMRA</b> CD45RA+ CD28-	Unstimuliert	3,7 ± 3,8	2,8; 0,0-10,1	2,2 ± 1,6	1,7; 0,0-5,0	4,9 ± 6,4	2,7; 0,0-17,9	0,694	0,930	0,657
	GAD65	2,4 ± 0,9	2,1; 1,3-3,8	2,7 ± 3,1	1,3; 0,0-8,2	5,0 ± 7,9	2,2; 0,0-26,2	0,606	0,315	0,549
	IAA	2,6 ± 3,6	1,4; 0,0-9,7	1,7 ± 1,9	1,5; 0,0-5,5	7,1 ± 13,9	2,7; 0,5-48,4	0,918	0,211	<b>0,046</b>
	IA2	0,5 ± 0,3	0,8; 0,4-1,1	1,9 ± 5,0	0,0; 0,0-14,3	0,5 ± 1,5	0,0; 0,0-4,2	0,852	0,950	0,721
	Candida	1,1 ± 1,3	1,1; 0,0-3,7	3,5 ± 5,4	1,6; 0,0-16,4	4,6 ± 5,3	3,4; 0,0- 18,9	0,351	0,069	0,370
<b>Tregs</b> CD25+	Unstimuliert	65,7 ± 27,0	70,3; 29,5-92,4	55,6 ± 28,2	48,1; 22,7-95,2	52,0 ± 33,2	53,1; 8,7-95,5	0,408	0,328	1,000
	GAD65	57,8 ± 26,4	66,6; 23,6-89,0	65,2 ± 25,2	78,0; 29,7-93,2	58,4 ± 24,5	51,5; 31,2-96,8	0,606	1,000	0,905
	IAA	65,1 ± 21,9	73,1; 38,1-89,3	66,5 ± 25,3	65,2; 29,7-92,2	56,8 ± 21,0	52,0; 28,8-94,3	0,606	0,417	0,549
	IA2	34,3 ± 32,0	34,8; 0,0-70,8	41,3 ± 22,7	41,4; 14,9-78,0	36,0 ± 23,9	35,0; 2,6-72,6	0,755	0,755	0,789
	Candida	48,7 ± 27,0	52,4; 0,0-86,4	55,8 ± 27,6	50,0; 10,3-85,6	39,9 ± 20,0	40,7; 0,0-70,0	0,758	0,328	0,152
<b>Th17</b> CD161+	Unstimuliert	12,5 ± 16,5	4,0; 0,8-46,9	6,9 ± 4,8	6,3; 0,9-17,5	7,3 ± 6,9	6,1; 1,4-25,0	0,918	1,000	0,824
	GAD65	6,5 ± 10,2	3,6; 0,0-29,2	12,4 ± 11,7	7,9; 2,7-36,1	8,9 ± 4,8	7,4; 3,4-17,8	0,114	<b>0,043</b>	1,000
	IAA	5,8 ± 5,7	3,5; 1,3-17,9	8,6 ± 6,7	5,7; 1,2-22,1	7,7 ± 4,7	8,1; 1,5-19,2	0,408	0,109	1,000
	IA2	17,6 ± 18,1	13,1; 0,0-50,0	16,2 ± 19,2	9,3; 0,0-61,6	12,5 ± 18,5	5,1; 0,0-54,8	0,776	0,491	0,370
	Candida	9,9 ± 6,9	9,1; 0,0-18,6	9,2 ± 6,2	9,6; 1,4-21,2	9,9 ± 9,4	7,7; 0,0-30,6	0,918	0,596	0,882

Tabelle 27: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Subpopulationen in den proliferierten CD4+-T-Zellen bei HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 7 nur 6) Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Candida albicans (Candida), regulatorische T-Zelle (Treg), T-Helferzelle (Th), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD).

### 3.2.2. CD8-positive Th-Subpopulationen

Die Analyse der proliferierten CD8+-T-Zellen erfolgt ebenso wie die der proliferierten CD4+-T-Zellen. Es werden die Mittelwerte der proliferierten CD8+-T-Zellen in % an den Lymphozyten in Kultur verglichen. Im Vergleich zu den CD4+-T-Zellen, haben in allen Ansätzen deutlich weniger CD8+-T-Zellen proliferiert. Bei Betrachtung der Standardabweichungen zeigt sich, dass es wiederum große interindividuelle Unterschiede innerhalb der Kohorten gibt. Im unstimulierten Ansatz proliferieren bei EM und LS durchschnittlich mehr CD8+-T-Zellen als bei HD. Aus Abbildung 22 und Tabelle 28 geht hervor, dass sich nach Stimulation mit GAD65 die CD8+-T-Zellen bei EM durchschnittlich polarisieren lassen, wohingegen bei HD und LS die Mittelwerte dieser Zellen kleiner sind. Auch nach allen anderen Stimulationen proliferieren die CD8+-T-Zellen bei EM stärker als bei HD und LS. Einen signifikanten Unterschied der proliferierten CD8+-T-Zellen gibt es zwischen HD und LS nach Stimulation mit IA2 ( $p=0,029$ ). Hier proliferieren die CD8+-T-Zellen bei LS durchschnittlich doppelt so stark wie bei HD.

% CFSE-CD8+ in Lymphozyten	HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=11)		p-Wert		
	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
<b>Unstimuliert</b>	0,8 $\pm$ 0,4	0,9; 0,2-1,2	1,3 $\pm$ 0,6	1,5; 0,3-2,0	1,5 $\pm$ 1,2	1,0; 0,0-3,5	0,094	0,479	1,000
<b>GAD65</b>	0,6 $\pm$ 0,4	0,5; 0,2-1,3	4,3 $\pm$ 8,9	0,8; 0,3-27,8	0,7 $\pm$ 0,7	0,5; 0,1-2,3	0,114	0,887	0,243
<b>IAA</b>	1,0 $\pm$ 0,8	0,6; 0,2-2,1	1,7 $\pm$ 2,1	0,9; 0,2-7,0	1,1 $\pm$ 1,0	0,9; 0,1-3,6	0,470	0,791	0,503
<b>IA2</b>	0,2 $\pm$ 0,1	0,2; 0,1-0,4	0,4 $\pm$ 0,4	0,2; 0,1-1,2	0,8 $\pm$ 0,7	0,6; 0,2-2,2	0,282	<b>0,029</b>	0,279
<b>Candida albicans</b>	0,5 $\pm$ 0,4	0,3; 0,1-1,1	1,8 $\pm$ 1,9	0,7; 0,3-5,5	0,7 $\pm$ 0,7	0,4; 0,1-2,1	0,055	0,479	0,095

Tabelle 28: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der proliferierten CD8+-T-Zellen in den Lymphozyten in Kultur bei HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 7 nur 6). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

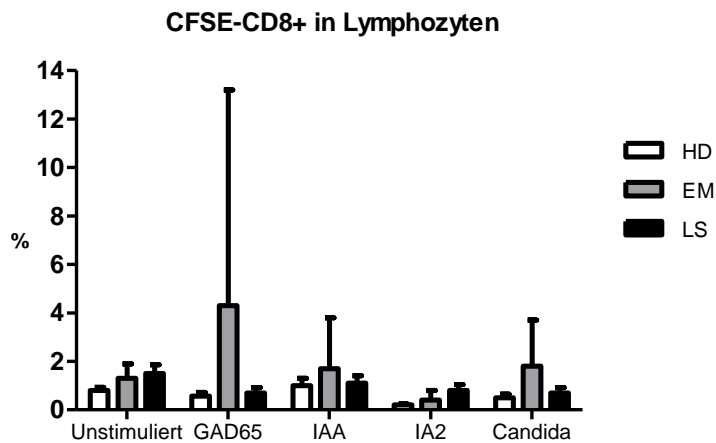


Abbildung 22: Anteil der proliferierten CD8+-T-Zellen an den Lymphozyten in Kultur. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Ansätze der verschiedenen Gruppen HD (weiß), EM (grau), LS (schwarz) dargestellt. Die y-Achse zeigt die % der proliferierten CD8+-T-Zellen in den Lymphozyten mit Standardabweichung des Mittelwertes. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Thyrosinphosphatase (IA2)

Nach Betrachtung der proliferierten CD8+-T-Zellen, folgt die Analyse der proportionalen Verteilung der CD8+-Th-Subpopulationen. Da die Zellen mit CFSE gefärbt wurden, wurde auf eine intrazelluläre Färbung verzichtet. Abbildung 23 zeigt repräsentativ die Differenzierung der Th-Subpopulationen mithilfe der BD Software FACS DIVA.

Bei der Untersuchung der Subpopulationen der proliferierten CD8+-T-Zellen in Tabelle 29 wird deutlich, dass sich die Proportionen in den Kohorten unterscheiden.

Ebenso wie bei den CD4+-T-Zellen, lässt sich analysieren, dass die naiven T-Zellen der EM im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit IA2 einen höheren Anteil an den CD8+-T-Zellen ausmachen als bei den LS und HD. Zwischen EM und LS ist dieser Unterschied nach Stimulation mit IA2 signifikant ( $p=0,038$ ). In allen anderen Ansätzen zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kohorten.

Der Anteil der Gedächtniszellen ist nach Stimulation mit *Candida albicans* bei den EM signifikant höher als bei den LS ( $p=0,012$ ). Auch im unstimulierten Ansatz und nach den anderen Stimulationen ist der Anteil der Gedächtniszellen bei den

EM höher als bei den LS und HD. Lediglich nach Stimulation mit IA2 weisen die EM durchschnittlich weniger Gedächtniszellen auf als die HD und LS.

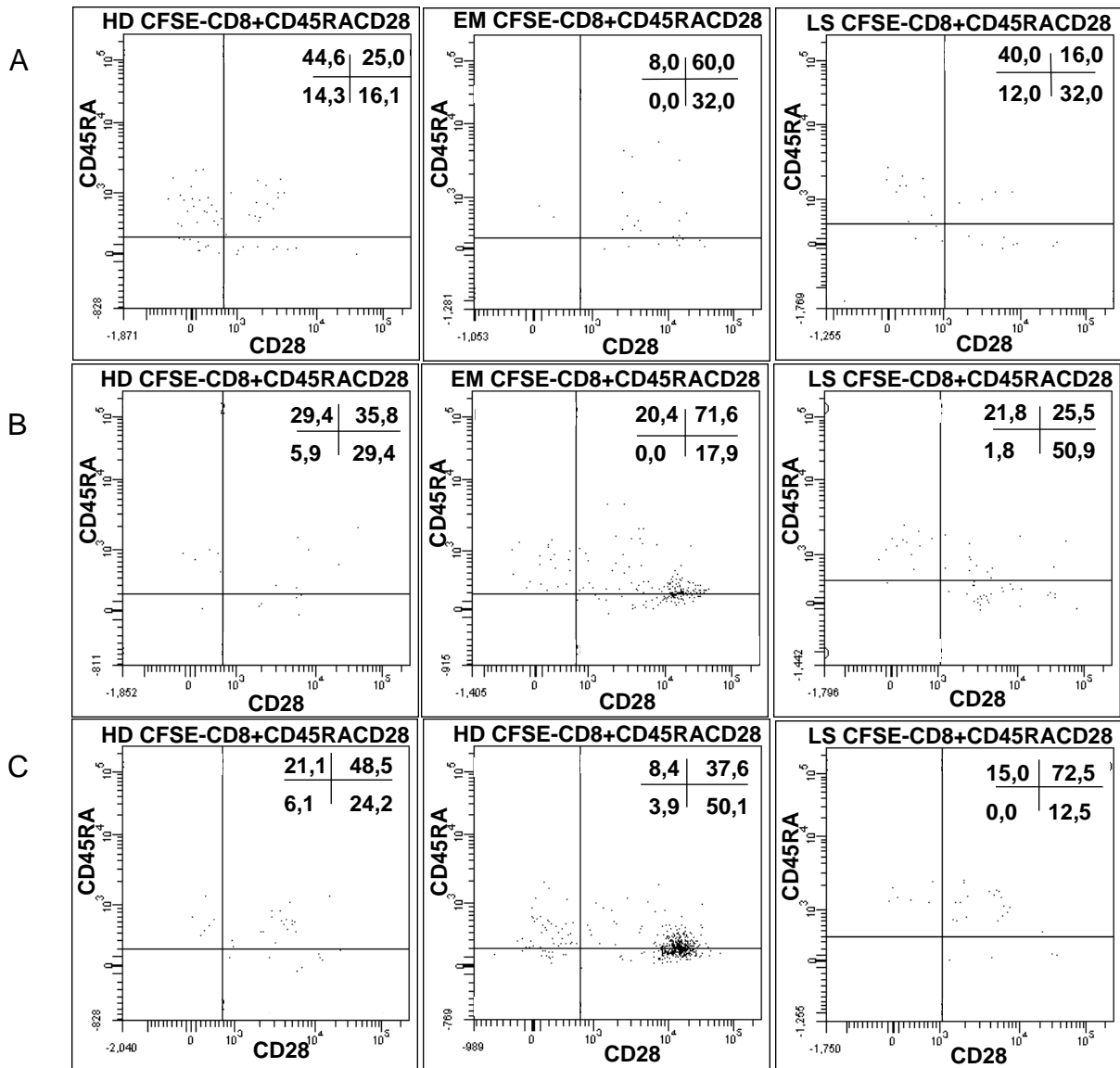


Abbildung 23: Repräsentative Darstellung der naiven T-Zellen (CD45RA+CD28+), der Gedächtniszellen (CD45RA-CD28+), der T-Effektorzellen (CD45RA+CD28-) und der TEMRA (CD45RA+CD28-) in den CFSE-CD8+-T-Zellen im unstimulierten Ansatz (A), nach Stimulation mit GAD65 (B) und *Candida albicans* (C). Die Zahlen sind in Prozent von den CFSE-CD8+-T-Zellen angegeben. In Spalte 1 ist ein HD, in Spalte 2 ein EM und in Spalte 3 ein LS exemplarisch dargestellt. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD)

Die Proportionen der CD8+-Effektorzellen verhalten sich ähnlich. Auch hier weisen die LS nach Stimulation mit IA2 signifikant mehr Effektorzellen auf als die EM. Auch im unstimulierten Ansatz ist der Anteil bei den EM deutlich kleiner als bei den HD und LS. Lediglich nach Stimulation mit GAD65 ist der durchschnittliche Anteil der Effektorzellen bei den EM größer als bei den HD.

Besonders auffallend ist, dass bei der Subpopulation der TEMRA vergleichsweise viele signifikante Unterschiede zwischen zwei Kohorten in verschiedenen Ansätzen vorliegen. Deshalb sind diese Ergebnisse in Abbildung 24 graphisch hervorgehoben. Die EM weisen nach allen Stimulationen deutlich weniger TEMRAs auf als die HD und LS. Nach Stimulation mit GAD65 und IAA sind diese Unterschiede signifikant. Auch im unstimulierten Ansatz (EM und HD) und nach Stimulation mit *Candida albicans* (EM und LS) zeigen sich Signifikanzen zwischen den Kohorten.

Bei Betrachtung der Tregs der CD8+-T-Zellen zeigt sich, dass in allen Ansätzen der durchschnittliche proportionale Anteil bei den EM höher ist als bei den HD und LS. Nach Stimulation mit IA2 ist der Unterschied zwischen HD und EM signifikant ( $p=0,043$ ). Mit Blick auf die Standardabweichung, Minima und Maxima, lässt sich feststellen, dass in allen drei Kohorten die interindividuellen Unterschiede sehr groß sind und somit die Mittelwerte kritisch betrachtet werden müssen (siehe Tabelle 29).

Die CD8+-Th17-Zellen zeigen kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Antigenen und den drei Kohorten. Die Unterschiede der proportionalen Verteilung nach den Stimulationen ähneln sich in den drei Kohorten.

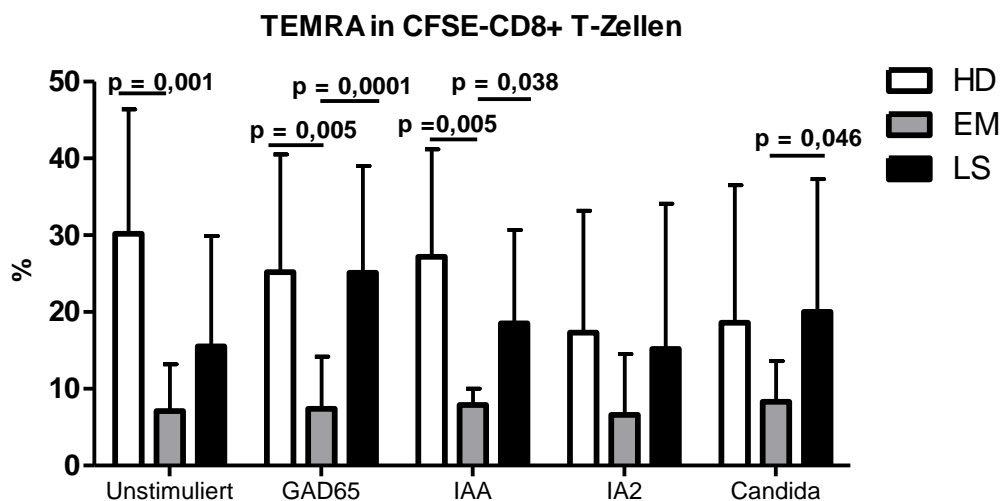


Abbildung 24: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der TEMRA in den proliferierten CD8+-T-Zellen mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Die x-Achse zeigt die Ansätze in HD, EM und LS an und die y-Achse repräsentiert die % der TEMRA in den proliferierten CD8+ T-Zellen. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

% von CFSE-CD8+-Zellen		HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=11)		p-Wert		
		Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
<b>Naive</b> CD45RA+ CD28+	Unstimuliert	27,4 ± 14,0	25,0; 8,2-47,2	45,9 ± 25,8	44,9; 12,8-76,0	30,6 ± 23,5	40,6; 0,0-69,6	0,232	1,000	0,206
	GAD65	39,2 ± 15,7	37,5; 15,4-58,9	39,8 ± 25,0	44,4; 7,9-72,2	35,0 ± 15,1	33,7; 7,5-61,5	1,000	0,669	0,720
	IAA	30,0 ± 10,9	23,8; 18,9-46,2	33,9 ± 19,8	39,7; 6,9-63,2	36,1 ± 19,6	32,4; 15,2-83,3	0,918	0,596	0,824
	IA2	55,3 ± 34,2	58,4; 0,0-100,0	71,0 ± 26,7	74,1; 37,1-100,0	41,0 ± 24,7	39,4; 3,7-77,4	0,573	0,414	<b>0,038</b>
	Candida	39,1 ± 29,6	48,5; 0,0-59,8	33,4 ± 16,3	27,4; 16,4-65,0	45,5 ± 17,3	37,6; 26,3-72,5	0,470	0,724	0,095
<b>Gedächtnis</b> CD45RA- CD28+	Unstimuliert	28,2 ± 15,0	22,6; 16,1-59,5	42,4 ± 24,2	43,7; 11,5-71,8	28,5 ± 17,3	31,4; 0,0-60,4	0,463	0,724	0,272
	GAD65	31,6 ± 9,9	14,8; 0,0-40,9	45,0 ± 29,0	45,5; 0,0-81,9	31,8 ± 20,9	30,1; 0,0-70,0	0,470	1,000	0,315
	IAA	30,1 ± 13,5	25,7; 18,5-56,1	47,9 ± 20,2	47,1; 17,6-73,7	33,4 ± 19,2	32,4; 0,0-68,9	0,091	0,536	0,112
	IA2	22,1 ± 26,5	17,4; 0,0-71,4	21,2 ± 23,1	14,3; 0,0-50,7	32,7 ± 18,9	27,5; 12,9-68,4	1,000	0,282	0,328
	Candida	29,6 ± 9,1	25,0; 23,7-47,1	48,5 ± 20,3	50,1; 15,0-73,1	26,5 ± 18,7	32,6; 0,0-50,0	0,091	0,860	<b>0,012</b>
<b>Effektor</b> CD45RA- CD28-	Unstimuliert	14,2 ± 15,2	11,1; 3,2-47,5	4,7 ± 5,9	1,9; 0,0-15,2	16,4 ± 21,0	9,8; 0,0-65,7	0,072	0,791	0,152
	GAD65	3,9 ± 2,7	3,6; 0,0-7,4	7,7 ± 10,2	4,0; 0,0-27,8	8,2 ± 7,6	7,5; 0,0-20,7	1,000	0,270	0,720
	IAA	12,7 ± 7,5	10,7; 0,0-22,0	10,4 ± 10,2	7,0; 0,0-27,6	12,1 ± 12,4	6,8; 0,0-38,3	0,536	0,536	0,941
	IA2	5,3 ± 10,0	0,0; 0,0-25,0	1,3 ± 3,5	0,0; 0,0-10,0	11,5 ± 6,3	12,7; 1,8-18,5	0,573	0,108	<b>0,001</b>
	Candida	11,8 ± 12,2	8,0; 0,0-27,8	9,7 ± 9,7	5,2; 0,0-27,4	8,1 ± 6,8	5,6; 0,0-18,9	0,606	0,375	0,824
<b>TEMRA</b> CD45RA+ CD28-	Unstimuliert	30,2 ± 16,2	27,8; 12,2-58,1	7,1 ± 6,1	7,9; 0,0-19,2	15,5 ± 14,4	12,5; 0,0-40,0	<b>0,001</b>	0,069	0,206
	GAD65	25,2 ± 15,3	22,7; 7,4-46,2	7,4 ± 6,8	7,1; 0,0-27,8	25,1 ± 13,9	22,5; 13,0-62,5	<b>0,005</b>	0,887	<b>0,0001</b>
	IAA	27,2 ± 14,0	25,5; 6,6-47,6	7,9 ± 2,1	5,3; 0,0-29,4	18,5 ± 12,2	17,4; 0,0-38,9	<b>0,005</b>	0,179	<b>0,038</b>
	IA2	17,3 ± 15,9	18,9; 0,0-37,5	6,6 ± 7,9	3,0; 0,0-20,0	15,2 ± 18,9	10,5; 0,0-59,3	0,345	0,852	0,328
	Candida	18,6 ± 17,9	14,4; 0,0-50,0	8,3 ± 5,3	6,2; 1,9-15,0	20,0 ± 17,3	13,0; 5,3-57,9	0,470	1,000	<b>0,046</b>
<b>Tregs</b> CD25+	Unstimuliert	38,0 ± 20,9	35,7; 12,5-67,1	50,4 ± 29,5	46,7; 0,0-90,4	43,2 ± 31,4	46,8; 0,0-92,9	0,351	0,724	0,710
	GAD65	44,4 ± 29,4	35,0; 12,5-88,9	59,4 ± 31,9	14,1; 0,0-100,0	45,7 ± 28,5	50,6; 0,6-81,8	0,299	1,000	0,356
	IAA	47,7 ± 32,1	65,8; 5,6-78,3	50,4 ± 30,1	54,4; 0,0-85,3	47,9 ± 28,2	51,0; 1,8-80,7	0,918	0,887	0,780
	IA2	10,8 ± 12,5	9,1; 0,0-28,6	36,2 ± 30,6	27,9; 2,5-100,0	33,0 ± 19,9	29,9; 0,0-69,2	<b>0,043</b>	0,029	0,798
	Candida	26,3 ± 29,1	20,0; 0,0-90,0	41,5 ± 32,7	37,5; 0,0-81,8	24,4 ± 16,8	26,7; 0,0-50,0	0,470	0,724	0,331
<b>Th17</b> CD161+	Unstimuliert	17,7 ± 15,2	14,3; 0,0-47,3	16,7 ± 15,3	7,7; 4,9-41,2	14,9 ± 11,6	10,5; 0,0-92,9	0,606	0,724	0,824
	GAD65	19,6 ± 16,1	14,8; 0,0-40,9	21,7 ± 31,1	14,1; 0,0-100	10,9 ± 5,7	11,1; 0,0-18,3	0,536	0,417	0,661
	IAA	17,7 ± 6,2	18,6; 6,5-24,4	15,8 ± 13,7	9,1; 3,8-42,0	20,7 ± 21,1	10,8; 0,0-65,4	0,529	0,562	0,497
	IA2	17,1 ± 13,8	22,8; 0,0-28,6	19,8 ± 31,3	8,3; 0,0-100,0	17,9 ± 22,5	14,3; 0,0-69,2	0,607	0,755	1,000
	Candida	10,8 ± 6,7	13,3; 0,0-20,0	11,9 ± 17,0	8,0; 0,0-54,5	9,3 ± 9,0	6,4; 0,0-23,5	0,470	0,596	1,000

Tabelle 29: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Subpopulationen in den proliferierten CD8+-T-Zellen bei HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 7 nur 6). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Candida albicans (Candida), regulatorische T-Zelle (Treg), T-Helferzelle (Th), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)



### **3.3. Analyse der Polarisierbarkeit der Chemokinrezeptor-positiven T-Zellen**

Da Chemokine, wie in Kapitel 1.2.3. beschrieben, über spezifische Chemokinrezeptoren T-Helferzellen rekrutieren und aktivieren können, werden in diesem Kapitel die auf den Th-Zellen befindlichen Chemokinrezeptoren analysiert. Verschiedene Chemokinrezeptoren repräsentieren unterschiedliche Th-Subpopulationen. Im ersten Abschnitt 3.3.1 werden die proliferierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und die Chemokinrezeptoren CCR5, CCR6 und CXCR3 untersucht. Im zweiten Abschnitt 3.3.2 folgt die Analyse der gleichen Chemokinrezeptoren auf den proliferierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.

#### **3.3.1. Chemokinrezeptor-positive CD4<sup>+</sup>-T- Zellen**

Bei Betrachtung des Einflusses der diabetesspezifischen Antigene und *Candida albicans* auf den Phänotyp der Chemokinrezeptor-positiven T-Zellen, lassen sich ebenfalls Unterschiede in den Kohorten feststellen.

Mit Blick auf Tabelle 30 lässt sich analysieren, dass sich die proliferierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der EM durch GAD65, IAA und *Candida albicans* zu proliferierten CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>-T-Zellen polarisieren lassen. Im Gegensatz zu den CCR5<sup>+</sup>-T-Zellen der HD und LS, zeigen die CCR5<sup>+</sup>-T-Zellen der EM in diesen Ansätzen deutlich höhere Mittelwerte und Mediane als im unstimulierten Ansatz. Während der durchschnittliche Anteil bei den HD und LS nach Stimulation mit GAD65 und IAA im Vergleich zum unstimulierten Ansatz annähernd gleich ist, ist dieser nach Stimulation mit IA2 und *Candida albicans* kleiner. Signifikante Unterschiede liegen in dieser Subpopulation nicht vor.

Im Gegensatz dazu, weisen die EM und LS über allen Ansätzen weniger proliferierten CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>-T-Zellen auf als die HD. Nach Stimulation mit IAA zeigt sich bei diesem Phänotyp ein signifikanter Unterschied zwischen den LS und den HD ( $p=0,003$ ). Besonders wenig CXCR3<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen sich bei den EM und LS nach Stimulation mit IA2 und *Candida albicans*.

Während die durchschnittliche Verteilung der CD4+CCR6+-T-Zellen bei den EM und LS in den verschiedenen Ansätzen keine großen Unterschiede aufweist, zeigt sich bei den HD, dass sich die CCR6+-T-Zellen nach Stimulation mit *Candida albicans* polarisieren lassen. Bei diesem Ansatz ist der prozentuale Anteil der CCR6+-T-Zellen an den proliferierten CD4+-T-Zellen der HD signifikant größer als bei LS ( $p=0,011$ ).

Die Effektor-Tregs mit der Phänotypisierung CD4+CD25+CCR5+ zeigen hingegen Unterschiede im Reaktionsverhalten auf die Antigene. Während die HD und LS kaum auf die diabetesspezifischen Antigene und *Candida albicans* reagieren und der prozentuale Anteil der CD25+CCR5+-T-Zellen an den proliferierten CD4+-T-Zellen bei diesen Kohorten tendenziell gleich bleibt (IAA) oder kleiner ist (IA2 und *Candida albicans*), reagieren die EM mit einer Proliferation der Effektor-Tregs nach Stimulation mit GAD65, IAA und *Candida albicans*. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen HD und EM nach Stimulation mit GAD65 ( $p=0,031$ ). In Abbildung 25 sind ausschließlich die signifikanten Ergebnisse dargestellt.

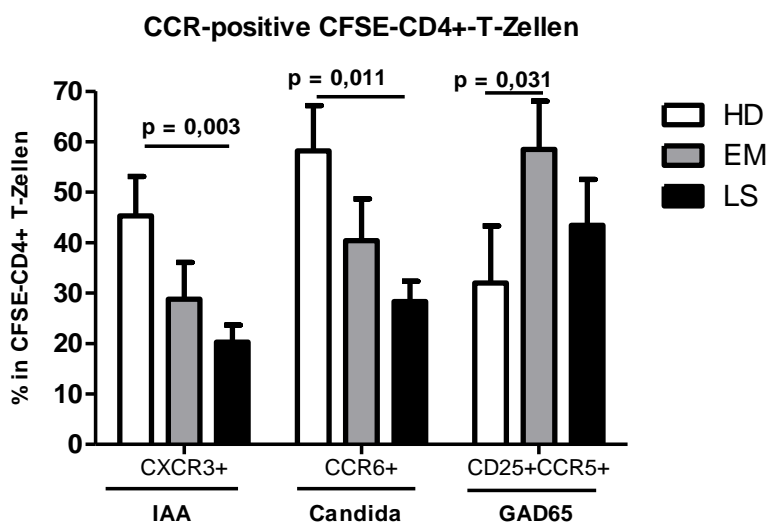


Abbildung 25: Durchschnittlicher prozentualer Anteil von CXCR3+ in IAA, CCR6+ in *Candida albicans* und CD25+CCR5+ in GAD65 an den proliferierten CD4+-T-Zellen mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Veranschaulicht sind die unterschiedlichen Ansätze in HD, EM und LS. Der p-Wert wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Abkürzungen: Chemokinrezeptor (CCR), Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

% von CFSE-CD4+		HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=11)		p-Wert		
		Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
Th1 CCR5+	Unstimuliert	42,1 ± 26,9	42,6; 4,5-77,1	47,0 ± 31,9	33,8; 2,0-87,8	38,7 ± 33,0	33,3; 0,0-89,7	0,758	0,724	0,603
	GAD65	35,4 ± 28,2	25,0; 9,1-82,2	61,5 ± 27,9	80,0; 21,9-88,8	47,6 ± 27,5	42,4; 9,5-93,0	0,055	0,270	0,497
	IAA	45,1 ± 21,5	44,9; 15,4-74,5	56,8 ± 31,7	57,9; 7,5-88,8	42,3 ± 24,2	40,5; 12,0-93,7	0,351	0,669	0,356
	IA2	23,0 ± 27,1	11,7; 0,0-58,3	37,7 ± 23,6	34,1; 6,8-74,3	24,1 ± 22,5	22,2; 0,0-65,7	0,228	0,755	0,195
	Candida albicans	25,8 ± 18,2	25,6; 0,0-53,7	54,0 ± 31,7	48,8; 7,0-87,7	26,2 ± 18,3	23,1; 0,0-61,3	0,091	1,000	0,056
Th1 CXCR3+	Unstimuliert	42,5 ± 22,4	46,4; 13,2-72,0	21,5 ± 13,9	19,4; 0,0-40,0	23,1 ± 18,6	21,5; 0,0-44,1	0,094	0,069	0,657
	GAD65	28,7 ± 20,5	38,6; 2,4-48,1	24,4 ± 14,3	22,7; 0,0-44,5	13,7 ± 8,6	14,0; 0,0-25,9	0,470	0,230	0,095
	IAA	45,3 ± 20,6	35,6; 24,5-78,1	28,8 ± 21,9	26,3; 0,1-67,3	20,3 ± 11,2	21,3; 0,0-34,6	0,174	<b>0,003</b>	0,370
	IA2	23,1 ± 28,6	9,1; 1,6-72,7	14,0 ± 16,3	6,1; 0,0-42,3	13,0 ± 18,9	12,2; 0,0-60,0	0,673	1,000	0,574
	Candida albicans	25,6 ± 23,9	23,1; 1,4-70,0	18,5 ± 20,5	13,2; 0,1-68,8	11,6 ± 9,5	9,7; 0,0-25,7	0,470	0,179	0,503
Treg/ Th17 CCR6+	Unstimuliert	32,3 ± 12,2	29,3; 14,7-48,1	38,6 ± 28,7	35,9; 0,0-72,0	25,2 ± 17,8	22,5; 0,0-56,8	1,000	0,179	0,657
	GAD65	26,9 ± 7,9	29,3; 12,9-34,3	36,4 ± 21,1	60,6; 12,8-72,5	23,7 ± 13,5	18,4; 11,8-56,4	0,681	0,270	0,133
	IAA	32,1 ± 19,4	29,0; 12,9-71,1	29,1 ± 17,7	28,1; 10,0-63,2	25,4 ± 9,5	24,5; 12,9-44,6	0,681	0,536	0,882
	IA2	34,4 ± 12,7	34,1; 17,5-50,0	28,6 ± 17,6	29,9; 7,9-56,7	31,8 ± 22,2	29,2; 8,1-80,9	0,741	0,573	0,959
	Candida albicans	58,2 ± 23,7	46,2; 31,9-90,0	40,4 ± 24,9	50,1; 8,5-74,0	28,3 ± 13,5	28,1; 6,8-45,1	0,252	<b>0,011</b>	0,295
Effektor -Tregs CD25+ CCR5+	Unstimuliert	39,4 ± 29,4	42,6; 2,3-77,1	42,9 ± 34,4	29,1; 0,0-87,8	37,4 ± 33,3	27,1; 0,0-89,7	0,837	0,860	0,941
	GAD65	32,0 ± 29,9	19,4; 3,6-82,2	58,5 ± 28,6	75,1; 21,2-88,5	43,4 ± 30,3	37,9; 7,1-93,0	<b>0,031</b>	0,315	0,497
	IAA	43,1 ± 22,1	42,2; 15,4-73,8	55,4 ± 32,5	53,6; 5,6-88,6	39,6 ± 24,2	33,2; 12,0-93,1	0,351	0,740	0,356
	IA2	22,3 ± 26,9	10,6; 0,0-58,3	32,4 ± 22,4	29,5; 6,8-66,3	22,3 ± 20,5	10,3; 0,0-65,4	0,282	0,662	0,442
	Candida albicans	21,1 ± 19,2	20,8; 0,0-50,9	50,6 ± 32,6	42,6; 4,7-87,1	23,4 ± 18,1	20,9; 0,0-60,2	0,071	0,724	0,056

Tabelle 30: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der migrierenden T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen bei HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 7 nur 6). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), T-Helferzelle (Th), regulatorische T-Zelle (Treg), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

### 3.3.2. Chemokinrezeptor-positive CD8+-T-Zellen

Ähnlich wie bei den proliferierten CD4+-T-Zellen, verhält es sich mit den Chemokinrezeptor-positiven T-Zellen der proliferierten CD8+-T-Zellen (siehe Tabelle 31).

Mit Blick auf die proliferierten CD8+CCR5+-T-Zellen fällt auf, dass die EM über allen Ansätzen mehr Zellen dieses Phänotyps aufweisen als die LS und die HD. Auffallend wenig CCR5+-T-Zellen zeigen sich bei den HD nach Stimulation mit IA2 und bei den LS nach Stimulation mit *Candida albicans*. Eine Polarisierung durch die verschiedenen Antigene fällt aus und es zeigen sich keine Signifikanzen zwischen den Kohorten.

Gegensätzlich sieht es bei den proliferierten CD8+CXCR3+-T-Zellen aus. Hier zeigen sich über allen Ansätzen mehr Zellen mit dem Oberflächenmarker CXCR3 bei den HD als bei den anderen beiden Kohorten. Die EM und LS weisen ähnliche Zahlenwerte auf. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen HD und LS nach Stimulation mit IAA ( $p=0,020$ ). Auch bei diesem Phänotyp sind die proportionalen Verteilungen bei den verschiedenen Antigenen ähnlich und es zeigt sich keine spezifische Reaktion auf einen der Antigene.

Bei Betrachtung der proliferierten CD8+CCR6+-T-Zellen lässt sich eine Polarisierung nachweisen. Während beim unstimulierten Ansatz die EM im Vergleich zu den HD und LS durchschnittlich den größten proportionalen Anteil dieser Zellart aufweisen, verändert sich diese Verteilung nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans*. Nach den Stimulationen zeigt sich, dass die Menge der CCR6+-T-Zellen bei den HD deutlich größer ist, wohingegen die Antigene bei den EM einen proliferationshemmenden Einfluss haben. Bei den LS zeigen sich kaum Unterschiede. Nach Stimulation mit GAD65 weisen die CCR6+-T-Zellen der HD signifikant höhere Werte auf als bei EM ( $p=0,016$ ) und LS ( $p=0,003$ ). Zusätzlich zeigen sich signifikante Unterschiede nach Stimulation mit *Candida albicans* zwischen HD und LS ( $p=0,011$ ) und zwischen EM und LS ( $p=0,031$ ). Abbildung 26 stellt die signifikanten Ergebnisse der CXCR3+- und CCR6+-T-Zellen dar.

% von CFSE-CD8+-Zellen		HD (N=7)		EM (N=9)		LS (N=11)		p-Wert		
		Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
Th1 CCR5+	Unstimuliert	18,9 ± 9,2	20,0; 0,0-27,1	31,7 ± 27,4	32,0; 0,0-70,0	28,9 ± 22,7	25,8; 0,0-72,2	0,536	0,375	0,941
	GAD65	22,9 ± 13,9	27,3; 0,0-41,7	40,6 ± 33,8	31,4; 3,2-100,0	15,9 ± 18,7	11,6; 0,0-62,3	0,470	0,270	0,065
	IAA	26,0 ± 18,0	17,5; 2,8-50,7	27,3 ± 25,2	19,4; 0,0-70,2	23,7 ± 21,3	16,6; 0,0-71,4	0,918	0,536	0,780
	IA2	3,9 ± 6,3	0,0; 0,0-14,3	24,9 ± 33,3	17,2; 0,0-100,0	16,1 ± 22,1	10,3; 0,0-69,2	0,081	0,081	0,798
	Candida albicans	12,1 ± 6,7	14,3; 0,0-20,0	26,2 ± 20,5	25,0; 0,0-52,6	11,7 ± 13,5	6,7; 0,0-44,4	0,142	0,328	0,131
Th1 CXCR3+	Unstimuliert	58,3 ± 31,4	60,4; 0,2-94,4	33,3 ± 25,0	35,9; 0,0-72,0	33,4 ± 26,8	32,0; 0,0-65,7	0,054	0,211	0,904
	GAD65	63,8 ± 28,9	77,2; 18,5-92,3	37,1 ± 23,5	40,8; 0,0-81,5	35,3 ± 17,6	36,9; 0,0-56,3	0,142	0,043	0,905
	IAA	66,2 ± 16,8	64,1; 42,2-84,6	42,7 ± 22,9	52,6; 0,3-70,5	37,3 ± 23,4	46,3; 0,0-66,0	0,071	<b>0,020</b>	0,603
	IA2	61,0 ± 35,3	57,5; 22,2-100,0	22,4 ± 30,5	3,6; 0,0-75,0	33,1 ± 35,5	25,9; 0,0-87,1	0,059	0,142	0,505
	Candida albicans	56,3 ± 31,9	75,0; 5,9-87,5	29,5 ± 17,3	27,8; 0,4-53,5	31,2 ± 20,6	31,2; 0,0-64,9	0,114	0,085	0,766
Treg/ Th17 CCR6+	Unstimuliert	26,0 ± 20,2	19,6; 0,1-54,7	40,9 ± 25,3	38,0; 14,9-85,7	26,3 ± 17,5	21,3; 0,0-55,3	0,281	0,791	0,238
	GAD65	50,9 ± 13,9	52,2; 33,3-69,2	27,6 ± 19,0	27,0; 3,6-66,6	19,7 ± 18,4	13,8; 0,0-58,8	<b>0,016</b>	<b>0,003</b>	0,315
	IAA	38,9 ± 15,1	45,9; 18,2-55,5	26,3 ± 10,2	28,1; 10,3-41,2	27,5 ± 18,9	28,2; 0,0-66,3	0,091	0,179	0,882
	IA2	35,1 ± 29,0	31,0; 0,0-75,0	29,3 ± 33,7	11,6; 0,0-85,7	29,6 ± 27,9	20,9; 0,0-80,7	0,573	0,662	0,878
	Candida albicans	58,4 ± 24,3	52,9; 27,2-100,0	52,0 ± 23,9	61,2; 8,2-80,0	30,0 ± 19,0	26,0; 5,3-65,0	0,758	<b>0,011</b>	<b>0,031</b>
Effektor -Tregs CD25+ CCR5+	Unstimuliert	12,3 ± 12,4	7,1; 2,3-77,1	30,1 ± 27,4	28,0; 0,0-69,7	27,2 ± 23,7	25,8; 0,0-72,2	0,174	0,211	0,766
	GAD65	19,4 ± 14,8	14,8; 0,0-41,7	38,4 ± 35,5	27,5; 0,0-100,0	21,4 ± 24,5	11,1; 0,0-67,1	0,470	0,740	0,278
	IAA	19,2 ± 18,9	12,5; 0,0-50,7	26,2 ± 25,7	12,9; 0,0-70,2	23,3 ± 21,6	15,8; 0,0-71,4	0,606	0,740	0,905
	IA2	0,0 ± 0,0	0,0; 0,0-0,0	23,6 ± 33,6	14,9; 0,0-100,0	15,5 ± 20,9	10,3; 0,0-65,4	0,059	<b>0,020</b>	0,574
	Candida albicans	8,0 ± 6,2	7,7; 0,0-20,0	24,9 ± 21,3	25,0; 0,0-52,6	11,1 ± 13,9	6,7; 0,0-44,4	0,174	0,930	0,175

Tabelle 31: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der migrierenden T-Zellen in den proliferierten CD8+-T-Zellen bei HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 7 nur 6). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), T-Helferzelle (Th), regulatorische T-Zelle (Treg), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

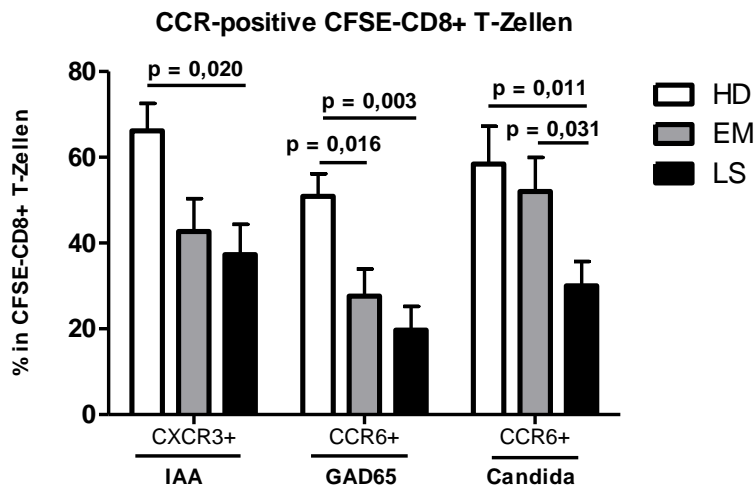


Abbildung 26: Durchschnittlicher prozentualer Anteil von CXCR3+ in IAA, CCR6+ in GAD65 und *Candida albicans* an den proliferierten CD4+-T-Zellen mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Veranschaulicht sind die unterschiedlichen Ansätze in HD, EM und LS. Der p-Wert wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Abkürzungen: Chemokinrezeptor (CCR), Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

Bei Analyse der proliferierten CD8+CD25+CCR5+-Effektor-Tregs fällt auf, dass die EM über allen Ansätzen eine durchschnittlich höhere Proliferationsaktivität zeigen als die HD und LS. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz ist jedoch die Proliferation lediglich bei den EM und HD nach Stimulation mit GAD65 höher. Da die HD nach Stimulation mit IAA keinerlei Effektor-Tregs besitzen, besteht hier ein signifikanter Unterschied zwischen HD und LS ( $p=0,020$ ).

Ausgeschlossen in dieser Abbildung ist die Signifikanz der Effektor-Tregs zwischen HD und LS nach Stimulation mit IA2, da das durchschnittliche Ergebnis bei HD gleich null ist.

### 3.4. Analyse der Transkriptionsfaktoren Tbet, RORc und FoxP3

Nach der Phänotypisierung der PBMCs nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* folgt die Analyse der Transkriptionsfaktoren Tbet, Rorc und FoxP3. Diese Th-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Tbet: Th1, RORc: Th17, FoxP3: Treg) dienen zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung der Th-Subpopulationen nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans*. Des

Weiteren werden Korrelationen zu den in den vorigen Kapiteln beschriebenen Th-Subpopulationen gebildet und analysiert. Die Messung der Transkriptionsfaktoren erfolgte an den PBMCs der HD, EM und LS. Insgesamt wurden bei fünf HD, vier EM und sechs LS eine qPCR von Tbet, RORc und FoxP3 durchgeführt. Aufgrund methodischer Ursachen konnte bei einzelnen Ansätzen nicht jede Probe ausgewertet werden, sodass die Anzahl der analysierten Proben kleiner ist als die der ursprünglich untersuchten Proben (N z.B. statt 5 nur 4). Bei den Korrelationsanalysen müssen die signifikanten Korrelationen aufgrund der niedrigen Fallzahl kritisch betrachtet werden.

#### **3.4.1. Relative Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren Tbet, RORc und FoxP3**

Ziel der relativen Quantifizierung mithilfe der  $\Delta$ CT-Methode ist es, eine Aussage über das Verhältnis von einem Zielgen (Tbet, RORc, und FoxP3) zu einem Housekeeping-Gen (B2M) zu machen. Die Berechnung der  $\Delta$ CT-Werte erfolgt, wie bereits in Kapitel 2.2.13 genauer beschrieben, indem von dem CT-Wert von B2M der CT-Wert des zu untersuchenden Transkriptionsfaktor subtrahiert wird. Umso kleiner der  $\Delta$ CT-Wert ist, desto größer die anfängliche Genkopienzahl.

Bei Betrachtung der  $\Delta$ CT-Werte von dem Th1-spezifischen Transkriptionsfaktor Tbet in Tabelle 32, fällt auf, dass es über allen Antigenen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten gibt. Der Vergleich des  $\Delta$ CT-Wertes des unstimulierten Ansatzes mit denen der spezifischen Antigene ergibt, dass die anfängliche Kopienzahl von Tbet in der unstimulierten Probe immer größer war als bei den anderen Antigenen. Das zeigt, dass die diabetesspezifischen Antigene und *Candida albicans* die Transkription von Tbet in allen drei Kohorten in unterschiedlicher Ausprägung hemmen. Ausgenommen sind die  $\Delta$ CT-Werte von HD und LS nach Stimulation mit IAA. Wie in Abbildung 27 und Tabelle 32 ersichtlich, zeigen die durchschnittlich höchste anfängliche Genkopienzahl die LS nach Stimulation mit IAA ( $\Delta$ CT=10,3). Insgesamt weisen die EM lediglich nach Stimulation mit IA2 eine höhere Kopienzahl auf als die HD und LS.

$\Delta$ CT-Werte	HD (N=5)		EM (N=4)		LS (N=6)		p-Wert		
	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
Unstimuliert	11,1 $\pm$ 1,1	11,6; 9,3-12,0	11,5 $\pm$ 1,1	11,0; 10,8-13,2	11,1 $\pm$ 0,7	11,2; 10,3-11,8	1,000	0,537	0,762
GAD65	13,1 $\pm$ 1,7	12,7; 11,4-15,5	14,0 $\pm$ 0,9	14,4; 12,9-14,6	13,0 $\pm$ 1,5	13,2; 10,6-14,8	0,400	0,730	0,571
IAA	11,0 $\pm$ 0,9	11,1; 9,9-12,1	12,1 $\pm$ 1,6	11,6; 10,7-14,4	10,3 $\pm$ 1,3	10,0; 9,1-12,0	0,486	0,343	0,200
IA2	12,6 $\pm$ 1,4	13,3; 11,0-14,0	12,3 $\pm$ 1,6	12,5; 10,5-13,8	12,8 $\pm$ 1,5	13,4; 10,8-14,1	1,000	1,000	0,730
Candida albicans	12,2 $\pm$ 1,5	12,2; 10,9-13,6	13,3 $\pm$ 1,2	13,1; 12,3-14,9	12,5 $\pm$ 1,3	12,4; 10,6-13,9	0,190	0,429	0,476

Tabelle 32: Durchschnittliche  $\Delta$ CT-Werte von Tbet (Th1) in den PBMCs in HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 5 nur 4). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

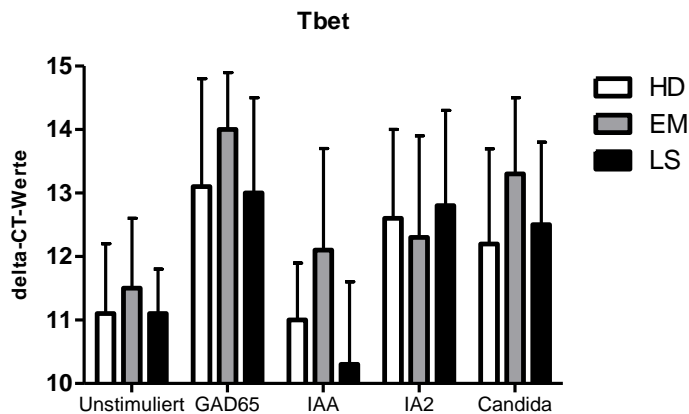


Abbildung 27: Durchschnittliche  $\Delta$ CT-Werte von Tbet (Th1) in den verschiedenen Ansätzen von HD, EM und LS mit der Standardabweichung des Mittelwerts. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

Ebenso wie bei Tbet wird unabhängig der Gruppenzugehörigkeit die Expression von RORc, einem spezifischen Transkriptionsfaktor der Th17-Zellen, durch die Antigene gehemmt, da die durchschnittlichen  $\Delta$ CT-Werte nach Stimulation höher sind als im unstimulierten Ansatz. Ausschließlich die EM zeigen nach Stimulation mit Candida albicans im Vergleich zur unstimulierten Probe eine minimal höhere ursprüngliche Genkopienzahl von RORc und haben einmalig eine höhere Expression von RORc als die HD und LS. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten. Die hohen Standardabweichungen, besonders bei EM, weisen darauf hin, dass große interindividuelle Unterschiede



vorhanden sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 und Abbildung 28 und dargestellt.

$\Delta$ CT-Werte	HD (N=5)		EM (N=4)		LS (N=6)		p-Wert		
	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
Unstimuliert	12,3 $\pm$ 2,9	13,7; 8,0-13,8	12,9 $\pm$ 4,1	14,1; 7,0-16,6	12,1 $\pm$ 2,1	12,5; 8,6- 13,8	0,686	0,556	0,413
GAD65	13,6 $\pm$ 2,7	14,6; 9,7-15,5	13,9 $\pm$ 3,5	14,1; 9,3-17,8	12,2 $\pm$ 2,9	13,2; 9,0-14,3	0,886	0,400	0,400
IAA	13,2 $\pm$ 2,7	13,3; 9,0-16,4	14,0 $\pm$ 6,7	16,5; 6,3-19,0	13,2 $\pm$ 2,7	13,4; 9,2-16,8	0,571	1,000	0,786
IA2	14,0 $\pm$ 2,6	14,7; 9,6-16,1	13,4 $\pm$ 3,8	14,1; 8,1-17,2	13,0 $\pm$ 2,5	13,2; 9,3-15,4	0,905	0,792	1,000
Candida albicans	14,3 $\pm$ 3,5	14,8; 9,8-18,0	12,8 $\pm$ 2,3	13,3; 9,7-14,9	13,2 $\pm$ 1,9	14,2; 10,2-14,9	0,486	0,730	0,730

Tabelle 33: Durchschnittliche  $\Delta$ CT-Werte von RORc (Th17) in den PBMCs in HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 5 nur 4). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

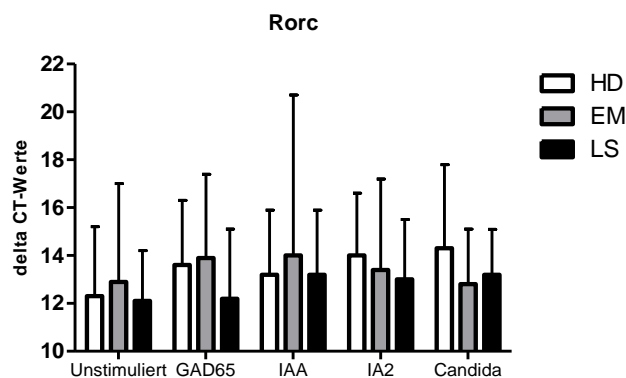


Abbildung 28: Durchschnittliche  $\Delta$ CT-Werte von RORc (Th17) in den verschiedenen Ansätzen von HD, EM und LS mit der Standardabweichung des Mittelwerts. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

Die Analyse der relativen Quantifizierung des FoxP3-Genabschnittes und somit der Treg-Zellen ergab ebenso keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Kohorten. Die Expression von FoxP3 bleibt bei den HD und EM nach Stimulation mit IAA annähernd gleich, während sie bei den LS kleiner ist. Nach Stimulation mit GAD65, IAA und Candida albicans, ist die anfängliche Kopienzahl von FoxP3 im Vergleich zum unstimulierten Ansatz unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit kleiner. Mithilfe von der in Tabelle 34 und Abbildung 29

dargestellten Standardabweichungen, ist zu erkennen, dass es große interindividuelle Abweichungen gibt.

$\Delta$ CT-Werte	HD (N=5)		EM (N=4)		LS (N=6)		p-Wert		
	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	HD-EM	HD-LS	EM-LS
Unstimuliert	11,7 $\pm$ 0,7	11,9; 10,4-12,3	11,5 $\pm$ 0,9	11,6; 10,4-12,5	11,6 $\pm$ 0,6	11,4; 11,1-12,7	1,000	0,548	1,000
GAD65	13,1 $\pm$ 1,4	13,1; 11,4-14,7	12,8 $\pm$ 2,2	12,3; 10,8-15,8	12,7 $\pm$ 1,3	12,9; 10,9-13,9	0,686	0,686	1,000
IAA	11,6 $\pm$ 0,9	11,4; 10,8-12,8	11,6 $\pm$ 2,7	10,6; 9,7-15,5	12,7 $\pm$ 2,7	11,4; 10,6-17,2	0,486	0,730	0,286
IA2	13,1 $\pm$ 1,1	13,5; 11,5-14,0	13,2 $\pm$ 2,3	13,1; 11,0-15,6	12,4 $\pm$ 1,3	12,4; 10,4-14,4	0,857	0,479	1,000
Candida albicans	11,8 $\pm$ 1,5	11,7; 10,0-13,9	12,6 $\pm$ 1,9	11,9; 11,2-15,4	12,8 $\pm$ 1,5	13,1; 11,0-14,5	0,730	0,329	1,000

Tabelle 34: Durchschnittliche  $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 (Treg) in den PBMCs in HD, EM und LS. Die p-Werte beziehen sich auf die Mittelwerte jeweils zweier Gruppen und wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 5 nur 4). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

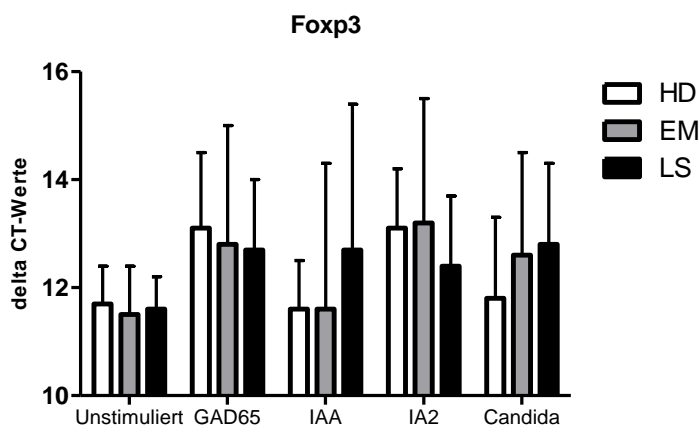


Abbildung 29: Durchschnittliche  $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 (Treg) in den verschiedenen Ansätzen von HD, EM und LS mit der Standardabweichung des Mittelwerts. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

### 3.4.2. Korrelationsanalyse zwischen Transkriptionsfaktoren und verschiedenen Th-Subpopulationen

Nach Abschluss der Untersuchung der Expression der Transkriptionsfaktoren werden diese auf Korrelationen mit verschiedenen phänotypischen Markern der proliferierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. Die Korrelation zwischen Tbet und CXCR3<sup>+</sup> beziehungsweise CCR5<sup>+</sup> ist für die Th1-Subpopulation interessant. RORc wird mit CCR6<sup>+</sup> in Korrelation gesetzt, um die Th17-Zellen zu analysieren

und für die Untersuchung der Tregs wird FoxP3 in Korrelation mit CD25+ und CD25+CCR5+ gesetzt. Die Korrelationsanalyse erfolgt mit der Rangkorrelation nach Spearman. Diese berechnet den linearen Zusammenhang zweier mindestens ordinalskaliertes Variablen. Nimmt der Korrelationskoeffizient  $r$  Werte  $> 0$  ein, liegt eine positive Korrelation vor. Das heißt, hohe Werte der einen Variablen gehen mit hohen Werten der anderen Variablen einher. Im Gegensatz dazu liegt eine negative Korrelation bei  $r$ -Werten  $< 0$  vor. In diesem Fall korrelieren hohe Ausprägungen der einen Variablen mit tiefen der anderen. Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  wird berechnet, da es ein Gütemaß des linearen Zusammenhangs ist. Dieses gibt an, wie gut die unabhängige Variable dazu geeignet ist, die Varianz der abhängigen Variable zu erklären.  $R^2$  kann Werte zwischen 0 und 1 einnehmen. Besitzt eine Regression ein  $r^2$  nahe 0, bedeutet das, dass die unabhängige Variable nicht geeignet ist, die abhängige Variable vorauszusagen. Nimmt  $r^2$  Werte nahe 1 an, liegt ein guter linearer Zusammenhang vor. Das Signifikanzniveau liegt bei  $p < 0,05$ . Da die Anzahl der Proben bei den Korrelationsberechnungen sehr klein ist, ist die statistische Aussagekraft von  $r$ ,  $r^2$  und  $p$  nur limitiert beurteilbar.

Die Analyse von proliferierten CD4+CXCR3+-T-Zellen und dem Th1-spezifischen Transkriptionsfaktor Tbet zeigte, dass die proliferierenden CD4+CXCR3+-T-Zellen der HD und EM im unstimulierten Ansatz, nach Stimulation mit GAD65, IAA und IA2 negativ mit Tbet korrelieren. Die Stärke der verschiedenen Korrelationen in den verschiedenen Ansätzen unterscheidet sich jedoch teilweise stark. Die LS weisen nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen eine positive Korrelation auf und lediglich nach Stimulation mit Candida albicans eine negative Korrelation. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen CXCR3+ und Tbet besteht wie in Abbildung 30 und Tabelle 35 dargestellt bei den EM nach Stimulation mit IA2. Das Bestimmtheitsmaß liegt bei  $r^2=0,685$ .

Korrelation zwischen den $\Delta$ CT-Werten von Tbet mit		HD (N=5)		EM (N=4)		LS (N=6)	
		Korrelationskoeffizient	p-Wert	Korrelationskoeffizient	p-Wert	Korrelationskoeffizient	p-Wert
<b>CXCR3+</b>	Unstimuliert	-0,500	0,391	-0,800	0,200	-0,086	0,872
	GAD65	-0,800	0,200	-0,500	0,667	0,300	0,624
	IAA	-0,200	0,800	-0,800	0,200	0,600	0,400
	IA2	-0,300	0,624	-1,000	<b>0,010</b>	0,051	0,935
	Candida albicans	0,200	0,800	-0,400	0,600	-0,657	0,156
<b>CCR5+</b>	Unstimuliert	0,000	1,000	0,000	1,000	-0,086	0,872
	GAD65	0,800	0,200	-0,500	0,667	-0,900	<b>0,037</b>
	IAA	0,800	0,200	-0,600	0,400	-1,000	<b>0,010</b>
	IA2	0,400	0,600	-0,400	0,600	-0,257	0,623
	Candida albicans	0,410	0,493	-0,400	0,600	-0,500	0,391

Tabelle 35: Korrelation zwischen den  $\Delta$ CT-Werten von Tbet und den % der proliferierten CXCR3+- beziehungsweise CCR5+-CD4+-T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 5 nur 4). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

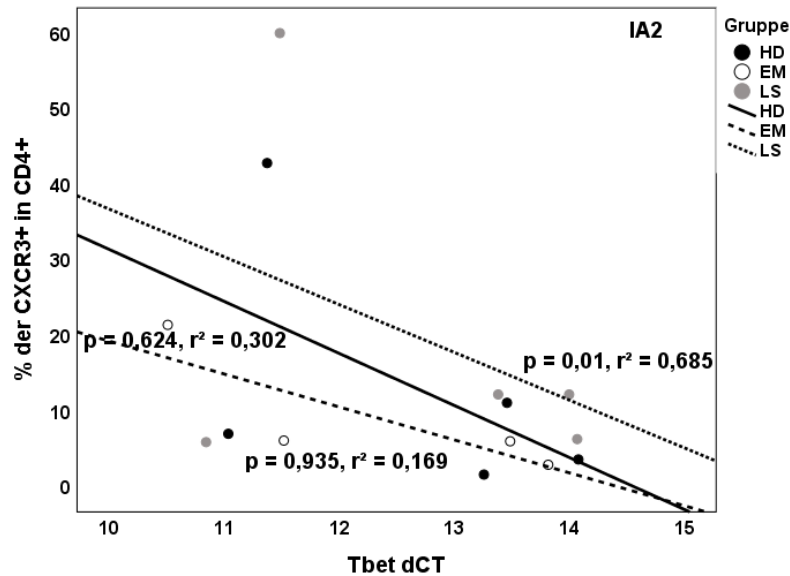


Abbildung 30: Korrelation zwischen den % der CXCR3+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der  $\Delta$ CT-Werte von Tbet auf der x-Achse nach Stimulation mit IA2. Die verschiedenen Punkte des Streudiagramms stellen die Werte der einzelnen Patienten der Kohorten HD, EM und LS dar, während die Linien die beste Anpassung für die Korrelationen zwischen den Werten anzeigt. Der p-Wert und die  $r^2$ -Werte sind angegeben. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Tyrosinphosphatase (IA2)

Dagegen zeigt die Untersuchung der Korrelation zwischen CCR5+-T-Zellen und Tbet, dass im unstimulierten Ansatz in allen drei Kohorten keine Korrelation zwischen den zwei Variablen besteht. Nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans*, weisen die EM und LS negative Korrelationen auf und die HD positive Korrelationen. Während es bei den EM keine signifikanten Korrelationen gibt, korrelieren bei den LS die CCR5+-T-Zellen und Tbet nach Stimulation mit GAD65 und IAA signifikant miteinander. Die p-Werte und die Bestimmtheitsmaße sind sowohl in Tabelle 35 als auch in Abbildung 31 ersichtlich. Die Bestimmtheitsmaße der signifikanten Ergebnisse deuten auf einen guten linearen Zusammenhang dieser Variablen hin.

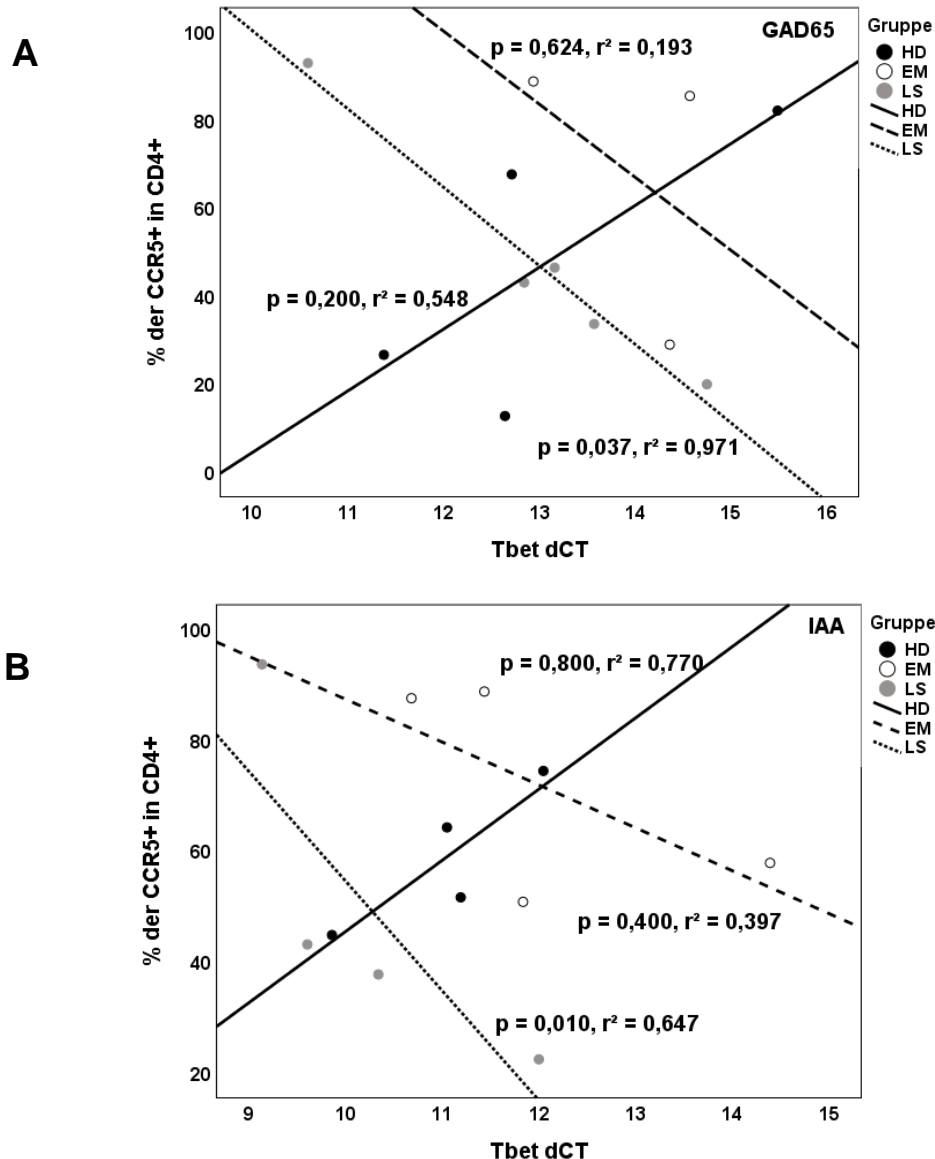


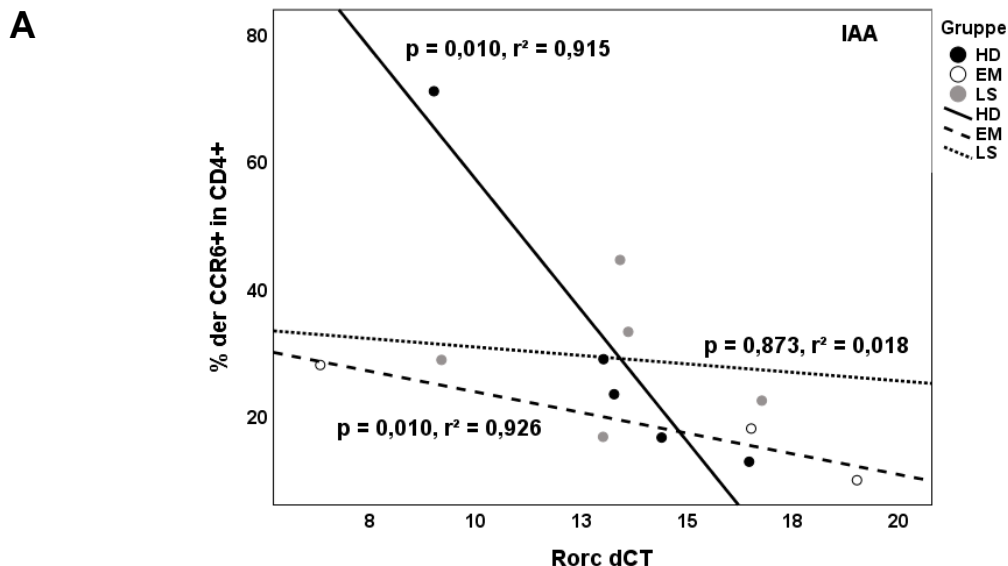
Abbildung 31: Korrelation zwischen den % der CCR5+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der  $\Delta$ CT-Werte von Tbet auf der x-Achse nach Stimulation mit GAD65 (A) und IAA (B). Die verschiedenen Punkte des Streudiagramms stellen die Werte der einzelnen Patienten der Kohorten HD, EM und LS dar, während die Linien die beste Anpassung für die Korrelationen zwischen den Werten anzeigt. Der p-Wert und die r<sup>2</sup>-Werte sind angegeben. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA)

Die Untersuchung der Korrelation zwischen proliferierten CD4+CCR6+-T-Zellen und dem in Th17-Zellen exprimierten Transkriptionsfaktor RORc, ergibt deutliche Unterschiede. Während die HD bei allen Ansätzen negative Korrelationen aufweisen, zeigen sich bei den EM und LS sowohl positive als auch negative Korrelationen (siehe Tabelle 36). Im unstimulierten Ansatz zeigen sich negative Korrelationen bei HD und EM und eine minimale positive Korrelation bei den LS. Nach Stimulation mit IAA gibt es sowohl bei den HD als auch bei den EM negative

Korrelationen zwischen CCR6+-T-Zellen und RORc, die signifikant sind. Auch nach Stimulation mit *Candida albicans* weisen die HD eine signifikante negative Korrelation auf. Wie in Abbildung 32 zu sehen, zeigt sich bei allen Signifikanzen ein  $r^2$  nahe 1 und somit ein sehr guter linearer Zusammenhang der beiden Variablen.

Korrelation zwischen den $\Delta$ CT-Werten von RORc mit		HD (N=5)		EM (N=4)		LS (N=6)	
		Korrelationskoeffizient	p-Wert	Korrelationskoeffizient	p-Wert	Korrelationskoeffizient	p-Wert
<b>CCR6+</b>	Unstimuliert	-0,600	0,400	-0,400	0,600	0,300	0,624
	GAD65	-0,800	0,200	0,800	0,200	0,500	0,667
	IAA	-1,000	<b>0,010</b>	-1,000	<b>0,010</b>	0,100	0,873
	IA2	-0,300	0,624	0,400	0,600	-0,400	0,600
	<i>Candida albicans</i>	-1,000	<b>0,010</b>	-0,400	0,600	-0,700	0,188
<b>CD161+</b>	Unstimuliert	0,400	0,600	0,600	0,400	-0,400	0,505
	GAD65	0,000	1,000	0,400	0,600	0,500	0,667
	IAA	0,600	0,285	0,500	0,667	0,900	<b>0,037</b>
	IA2	-0,700	0,188	1,000	<b>0,010</b>	-0,200	0,800
	<i>Candida albicans</i>	0,800	0,200	0,400	0,600	0,700	0,188

Tabelle 36: Korrelation zwischen den  $\Delta$ CT-Werten von RORc und den % der proliferierten CCR6+- beziehungsweise CD161+-CD4+-T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 5 nur 4). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)



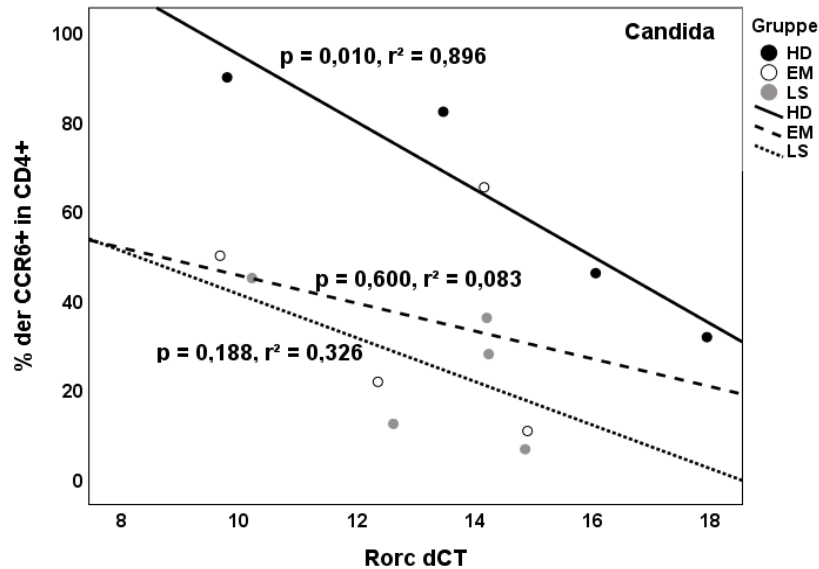
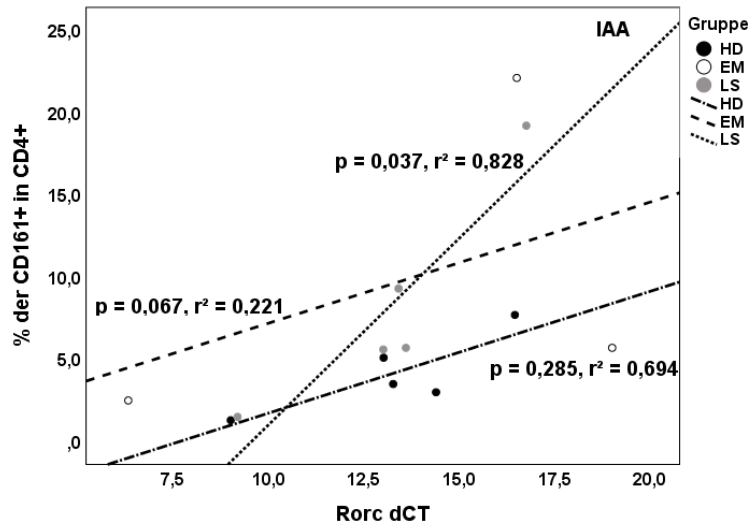
**B**

Abbildung 32: Korrelation zwischen den % der CCR6+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der  $\Delta$ CT-Werte von Tbet auf der x-Achse nach Stimulation mit IAA (A) und *Candida albicans* (B). Die verschiedenen Punkte des Streudiagramms stellen die Werte der einzelnen Patienten der Kohorten HD, EM und LS dar, während die Linien die beste Anpassung für die Korrelationen zwischen den Werten anzeigt. Der p-Wert und die  $r^2$ -Werte sind angegeben. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Humanes Insulin-Antigen (IAA)

Bei Betrachtung der Korrelation zwischen den proliferierten CD4+CD161+-T-Zellen und RORc, zeigen sich mehr positive Korrelationen als negative. Tabelle 36 stellt dar, dass die CD161+-T-Zellen im unstimulierten Ansatz bei EM und HD positiv mit RORc korrelieren und bei den LS negativ. Die positive Korrelation bleibt bei den EM nach allen Stimulationen erhalten und ist mit  $p = 0,01$  nach Stimulation mit IA2 signifikant. Bei diesem Ansatz zeigen die HD eine negative Korrelation und die LS keine Korrelation. Anders verhält sich die Korrelation bei den LS nach Stimulation mit IAA und *Candida albicans*. Hier zeigt sich eine starke positive Korrelation, welche nach Stimulation mit IAA signifikant ist (siehe Abbildung 33).



**A**



**B**

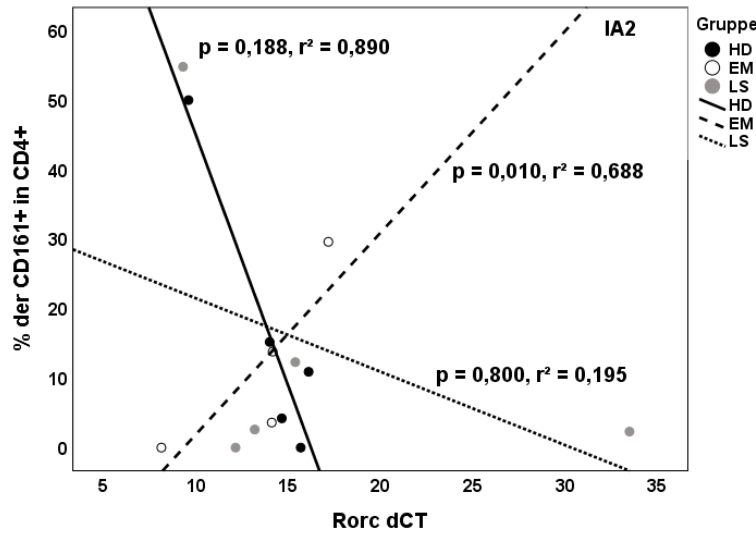


Abbildung 33: Korrelation zwischen den % der CD161+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der  $\Delta$ CT-Werte von RORc auf der x-Achse nach Stimulation mit IAA (A) und IA2 (B). Die verschiedenen Punkte des Streudiagramms stellen die Werte der einzelnen Patienten der Kohorten HD, EM und LS dar, während die Linien die beste Anpassung für die Korrelationen zwischen den Werten anzeigt. Der p-Wert und die  $r^2$ -Werte sind angegeben. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

Um die Treg-Zellen genauer zu betrachten, werden die Korrelationen der CD25+-T-Zellen und des  $\Delta$ CT-Wertes von FoxP3 verglichen. Hier fällt auf, dass die HD im unstimulierten Ansatz keine Korrelation aufweisen und nach den Stimulationen ausschließlich positive Korrelationen, das heißt, ein hoher Prozentsatz der CD25+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen geht mit einer niedrigen anfänglichen Genkopienzahl. Dahingegen zeigt Tabelle 37, dass die EM hauptsächlich negative Korrelationen aufweisen, die sich in den verschiedenen Ansätzen minimal unterscheiden. Bei den LS korrelieren CD25+

und FoxP3 nach Stimulation mit GAD65 negativ signifikant (siehe Abbildung 34). Bei allen anderen Ansätzen besteht keine Korrelation.

Korrelation zwischen den $\Delta$ CT-Werten von FoxP3 und...		HD (N=5)		EM (N=4)		LS (N=6)	
		Korrelationskoeffizient	p-Wert	Korrelationskoeffizient	p-Wert	Korrelationskoeffizient	p-Wert
<b>CD25+</b>	Unstimuliert	0,100	0,873	-0,600	0,400	0,200	0,747
	GAD65	0,400	0,600	-0,600	0,400	-1,000	<b>0,010</b>
	IAA	0,800	0,200	-0,400	0,600	0,100	0,873
	IA2	0,800	0,200	-0,500	0,667	-0,100	0,873
	Candida albicans	0,300	0,624	0,200	0,800	0,086	0,872
<b>CD25+ CCR5+</b>	Unstimuliert	0,000	1,000	-0,800	0,200	0,500	0,391
	GAD65	0,400	0,600	-0,600	0,400	-0,800	0,200
	IAA	0,800	0,200	0,000	1,000	0,100	0,873
	IA2	0,800	0,200	-0,500	0,667	-0,300	0,624
	Candida albicans	-0,205	0,741	-1,000	<b>0,010</b>	0,086	0,872

Tabelle 37: Korrelation zwischen den  $\Delta$ CT-Werten von FoxP3 und den % der CD25+ beziehungsweise CD25+CCR5+ proliferierten CD4+-T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Spearman. Aufgrund methodischer Ursachen ist N in den verschiedenen Kohorten teilweise kleiner als angegeben (z.B. statt 5 nur 4). Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2)

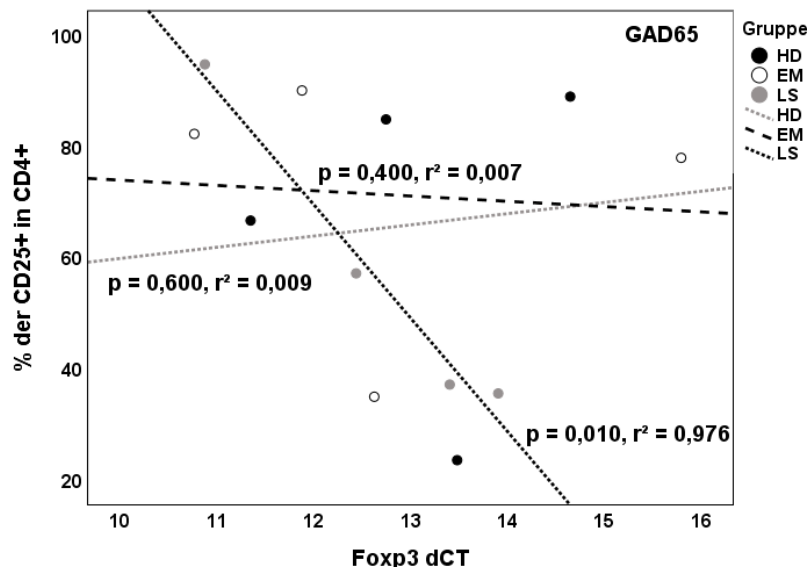


Abbildung 34: Korrelation zwischen den % der CD25+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der  $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 auf der x-Achse nach Stimulation mit GAD65. Die verschiedenen Punkte des Streudiagramms stellen die Werte der einzelnen Patienten der Kohorten HD, EM und LS dar, während die Linien die beste Anpassung für die Korrelationen zwischen den Werten anzeigt. Der p-Wert und die  $r^2$ -Werte sind angegeben. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD)

Die Korrelationen der Oberflächenmarker CD25+CCR5+ der Effektor-Tregs mit FoxP3 verhalten sich ähnlich wie die CD25+-T-Zellen. Auch hier zeigt sich bei den HD im unstimulierten Ansatz keine und bei Candida albicans eine minimale

negative Korrelation. Nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen korrelieren diese Zellen in der Kohorte positiv mit FoxP3. Die EM zeigen außer nach Stimulation mit IAA in allen anderen Ansätzen negative Korrelationen. Nach Stimulation mit *Candida albicans* ist diese, wie in Abbildung 35 zu sehen, signifikant. Die LS weisen ebenfalls eine starke negative Korrelation nach Stimulation mit GAD65 auf. Während die Korrelationen bei den anderen Antigenen schwach positiv oder negativ sind.

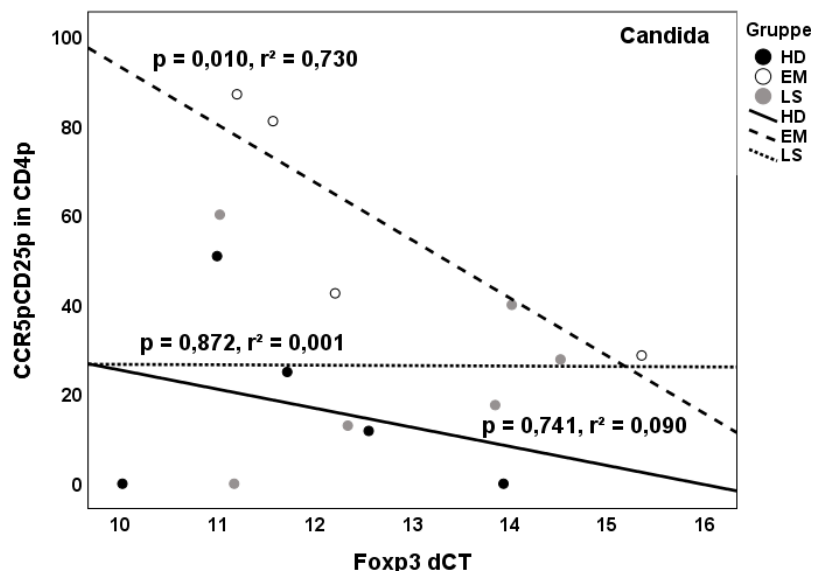


Abbildung 35: Korrelation zwischen den % der CCR5+CD25+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der  $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 auf der x-Achse nach Stimulation *Candida albicans*. Die verschiedenen Punkte des Streudiagramms stellen die Werte der einzelnen Patienten der Kohorten HD, EM und LS dar, während die Linien die beste Anpassung für die Korrelationen zwischen den Werten anzeigt. Der p-Wert und die r<sup>2</sup>-Werte sind angegeben. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS)

### 3.5. Polarisierbarkeit der Zytokinproduktion der PBMCs in

#### HD, EM und LS

Da die Zytokine, wie in Kapitel 1.2.3 und 1.2.4. beschrieben, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen einleiten oder regulieren können, wird im folgenden Kapitel analysiert, welche Zytokine von HD, LS und EM im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen produziert werden. Wie in Kapitel 3.4. wird die Konzentration auf den Zytokinen liegen, die hauptsächlich von Th1, Th17 und Treg produziert werden. Anschließend folgt ein Unterkapitel zu den Th2-spezifischen Zytokinen und IL-9.

Aufgrund der niedrigen Fallzahl der HD (N=3), wird in diesem Kapitel der Mann-Whitney-U-Test zur Berechnung der Signifikanzen nur zwischen EM und LS durchgeführt. Außerdem wird eine Stratifizierung zur Analyse der Unterschiede der verschiedenen Kohorten nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen durchgeführt. Hierfür wird sowohl ein Cut-off Wert auf Höhe der 25. Perzentile als auch ein Cut-off-Wert auf Höhe der 75. Perzentile bestimmt. Es ergibt sich pro Cut-off eine Gruppe oberhalb des Cut-off (high level Gruppe) und eine unterhalb dieses Cut-off (low to mediate level Gruppe). Mithilfe einer Kreuztabelle kann die Anzahl der positiven und negativen Proben zweier unterschiedlichen Kohorten, zum Beispiel HD und EM, verglichen werden. Die Berechnung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der positiven beziehungsweise negativen Proben zweier Kohorten besteht, wird mit dem Fisher's Exacta Test durchgeführt.

### **3.5.1. Th1-spezifischen Zytokine**

Die Th1-Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungen. Sie vermittelt die zelluläre Immunität gegen Krankheitserreger und aktiviert Makrophagen. Gleichzeitig spielt sie auch eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Während die von Makrophagen und NK-Zellen produzierten Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  die Th1-Zelle aktivieren und die Differenzierung anregen, produzieren die Th1-Zellen ihrerseits die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL1 $\beta$  [22, 93-95].

Bei Betrachtung der Tabelle 38 und der darin dargestellten Produktion des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  wird deutlich, dass im unstimulierten Ansatz im Vergleich zu EM bei HD das Fünffache und bei LS das Dreifache an IFN- $\gamma$  produziert wird. Durchschnittlich produzieren die HD in diesem Ansatz am meisten IFN- $\gamma$ . Auch nach Stimulation mit IAA sind die IFN- $\gamma$  Werte der HD und LS deutlich höher als die der EM. Nach Stimulation mit GAD65 sind die Konzentrationen in allen drei Kohorten kleiner und gleichen sich an. Die höchste Konzentration an IFN- $\gamma$  lässt sich sowohl bei EM als auch bei LS nach Stimulation mit *Candida albicans* messen. In diesem Ansatz produzieren die LS

durchschnittlich das Neunfache der HD und das Dreifache der EM. Die Daten sind deskriptiv der Tabelle 38 und graphisch der Abbildung 36 zu entnehmen.

Die Produktion von IL-12 ist im unstimulierten Ansatz bei EM und LS fast doppelt so hoch wie bei HD. Nach Stimulation mit GAD65 hingegen verdoppelt sich die Konzentration von IL-12 bei HD, während die Mittelwerte bei LS und EM annähernd gleichbleiben. Tabelle 38 und Abbildung 36 entnehmend, sind die IL-12-Werte nach Stimulation mit IAA bei den EM größer als bei HD und LS. Außerdem bleibt im Vergleich zum unstimulierten Ansatz die durchschnittliche IL-12-Konzentration nach Stimulation mit *Candida albicans* bei HD gleich, während sie bei EM und bei LS deutlich kleiner ist.

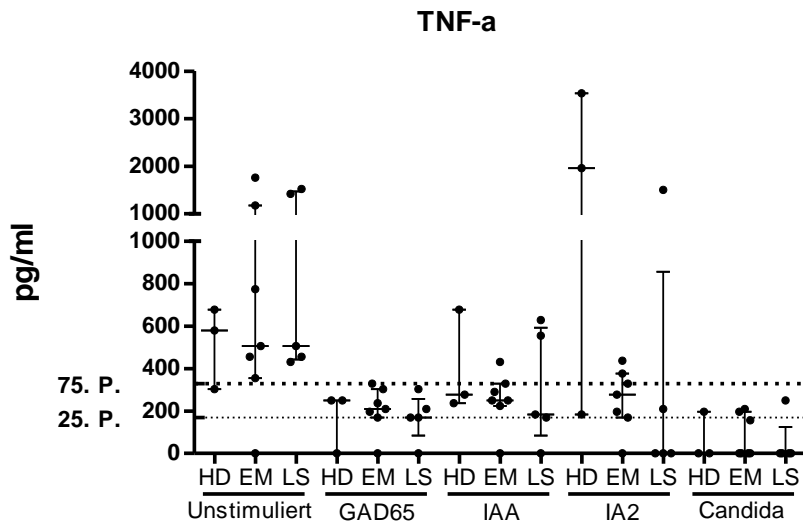
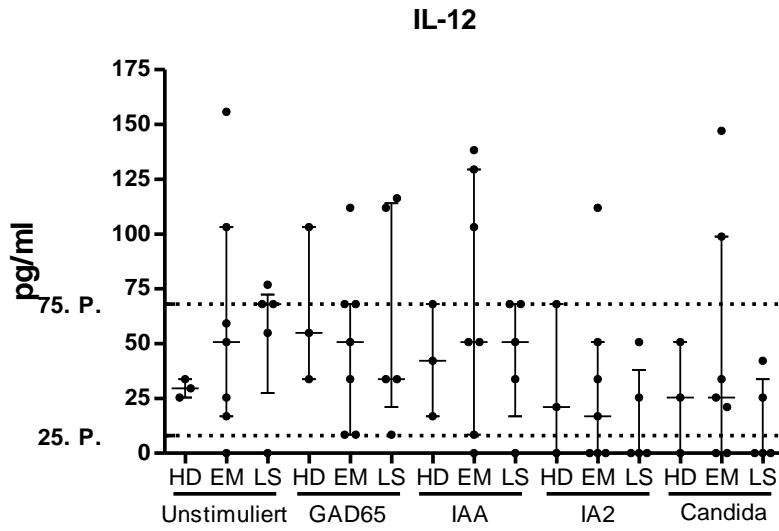
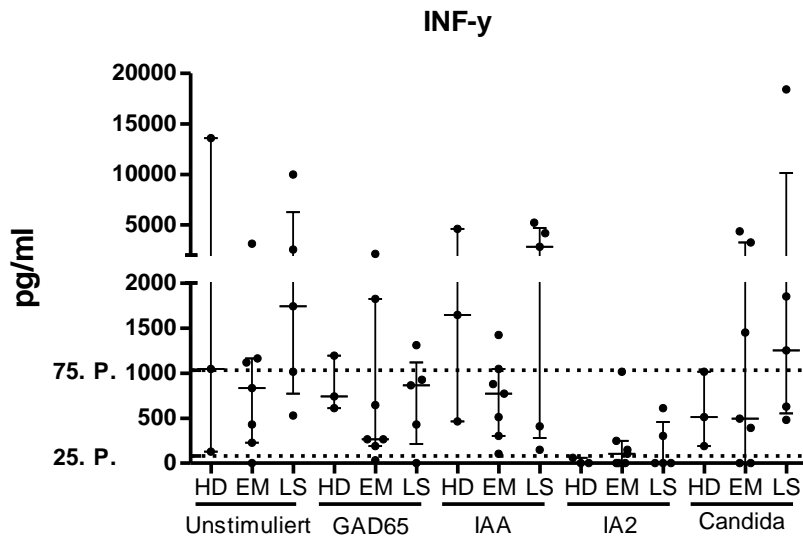
Das unter anderem von den Th1-Zellen produzierte TNF- $\alpha$  verhält sich tendenziell in allen drei Kohorten über allen Ansätzen gleich. Während im unstimulierten Ansatz die Konzentrationen relativ hoch sind, sind diese nach Stimulation mit GAD65, IAA, IA2 und *Candida albicans* in allen drei Kohorten klein. Lediglich nach Stimulation mit IA2 ist die Konzentration von TNF- $\alpha$  bei HD hoch. Nach Stimulation mit *Candida albicans* ist die Konzentration in allen drei Kohorten am kleinsten und mithilfe von Tabelle 38 und Abbildung 36 ist zu erkennen, dass es in diesem Ansatz große interindividuelle Unterschiede gibt.

Da es bei der Messung von IL-1 $\beta$  einzelne Werte gibt, die nicht im linearen Bereich der Sigmakurve liegen, das heißt, dass sie einen Wert unter dem Cut-off Wert von 30 % aufweisen, wird in diesem Fall auf eine detaillierte Beschreibung dieser Werte verzichtet.

Bei allen Th1-spezifischen Zytokinen ergibt die Stratifizierungsanalyse mit dem Cut-off auf Höhe der 25. Perzentile und der der 75. Perzentile keine signifikanten Unterschiede.

Th1-Zytokine	HD (N=3)		EM (N=7)		LS (N=5)		p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	
<b>IFN-γ</b>							
Unstimuliert	4927,1 ± 7532,4	1045,9; 126,8-13609,5	989,5 ± 1050,7	834,0; 0,0-3152,5	3169,0 ± 3884,1	1742,1; 530,1-9978,0	0,202
GAD65	848,6 ± 305,0	740,4; 612,4-1192,9	765,1 ± 853,8	266,3; 32,5-2133,1	705,4 ± 503,0	864,8; 0,0-1308,4	0,876
IAA	2245,3 ± 2146,2	1645,8; 462,6-4627,6	720,3 ± 451,3	771,8; 105,0-1422,2	2557,7 ± 2246,3	2835,5; 148,0-5215,0	0,343
IA2	19,5 ± 33,7	0,0; 0,0-58,4	216,6 ± 364,7	105,0; 0,0-1016,1	183,3 ± 273,5	0,4; 0,0-612,4	1,000
Candida albicans	572,7 ± 416,8	513,4; 188,8-10016,0	1427,5 ± 1737,6	496,5; 0,0-4373,7	4529,4 ± 7793,3	1250,9; 479,6-18436,5	0,432
<b>IL-12</b>							
Unstimuliert	29,6 ± 4,2	29,6; 25,3-33,8	58,7 ± 54,4	50,7; 0,0-155,8	53,6 ± 30,9	68,0; 0,0-76,8	0,755
GAD65	63,9 ± 35,6	54,9; 33,8-103,2	49,9 ± 37,0	50,7; 8,4-111,9	60,8 ± 49,7	33,8; 8,4-116,3	0,755
IAA	42,4 ± 25,6	42,2; 16,9-68,0	68,7 ± 55,9	50,7; 0,0-138,3	44,1 ± 28,5	50,7; 0,0-68,0	0,530
IA2	25,3 ± 25,3	25,3; 0,0-58,4	46,6 ± 55,4	25,3; 0,0-147,1	15,2 ± 22,7	0,0; 0,0-50,7	0,343
Candida albicans	29,7 ± 34,8	21,1; 0,0-68,0	30,5 ± 40,9	16,9; 0,0-111,9	13,5 ± 19,4	0,0; 0,0-42,2	0,530
<b>TNF-α</b>							
Unstimuliert	520,4 ± 195,7	580,3; 302,8-678,1	718,8 ± 587,1	506,1; 0,0-1763,8	867,4 ± 553,7	506,1; 430,9-1523,7	1,000
GAD65	166,9 ± 144,5	250,3; 0,0-250,3	206,4 ± 107,5	210,2; 0,0-328,8	170,4 ± 109,7	169,5; 0,0-302,8	0,432
IAA	397,3 ± 244,0	276,7; 237,0-3199,0	253,4 ± 131,4	250,3; 0,0-430,9	307,5 ± 271,2	183,2; 0,0-629,3	0,876
IA2	1892,7 ± 1677,7	1958,1; 183,2-3536,7	255,2 ± 147,1	276,7; 0,0-437,4	342,9 ± 655,6	0,0; 0,0-1504,3	0,149
Candida albicans	65,6 ± 113,6	0,0; 0,0-196,7	80,4 ± 101,6	0,0; 0,0-210,2	50,1 ± 111,9	0,0; 0,0-250,3	0,755
<b>IL-1β</b>							
Unstimuliert	2062,0 ± 2286,2	1107,4; 407,8-4670,7	1387,1 ± 1659,5	695,2; 0,0-4823,1	1156,3 ± 741,7	1422,6; 151,9-1798,0	0,755
GAD65	3030,7 ± 2216,4	3851,0; 521,1-4720,1	1347,0 ± 1166,5	943,0; 276,2-3152,8	1761,4 ± 1246,4	1568,2; 151,9-1635,4	0,530
IAA	1472,7 ± 1496,3	671,7; 547,6-3199,0	1039,0 ± 777,2	892,0; 151,9-2354,7	1876,1 ± 2193,0	1180,8; 0,0-5579,7	0,755
IA2	2822,0 ± 799,8	2971,2; 1958,1-3536,7	2788,0 ± 364,7	3514,6; 377,1-5336,4	3517,2 ± 2462,7	2941,5; 1504,3-7677,6	0,755
Candida albicans	3433,8 ± 1248,2	3071,4; 2407,0-4823,1	2561,4 ± 2705,0	1568,2; 311,5-7465,4	4419,3 ± 3303,1	3700,6; 1050,8-9788,9	0,268

Tabelle 38: Durchschnittliche Konzentration der Th1-spezifischen Zytokine IFN-γ, IL-12, TNF-α und IL-1β in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS. Der p-Wert bezieht sich auf die Mittelwerte der EM und LS und wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Bei Werten gleich 0 liegt die Konzentration unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), T-Helferzelle (Th), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)



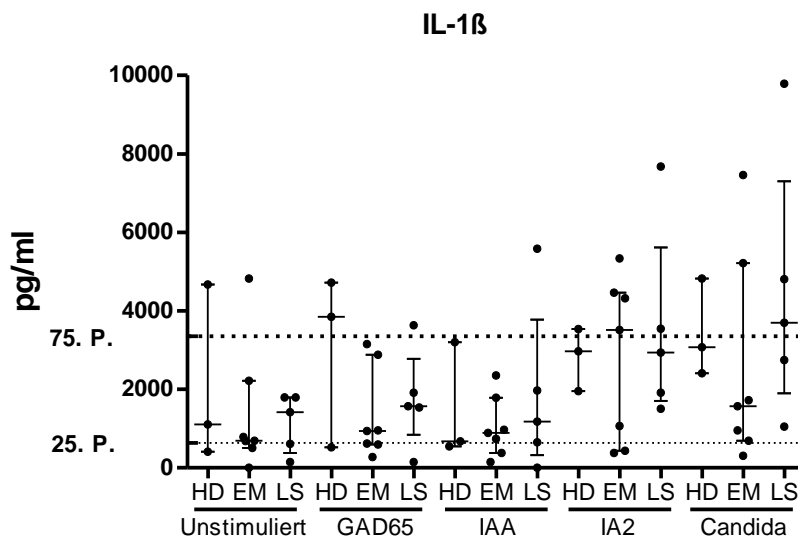


Abbildung 36: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit dem Median und der Interquartilsabstände. Auf der x-Achse sind die HD, EM und LS in den verschiedenen Ansätzen aufgeführt. Die y-Achse zeigt die Konzentrationen der einzelnen Zytokine und die Cut-offs auf Höhe der 25. und 75. Perzentile an. Abkürzungen: Interferon (IFN), Interleukin (IL), Tumornekrosefaktor (TNF), Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Pikogramm (pg), Milliliter (ml), Perzentile (P).

### 3.5.2. Th17-spezifische Zytokine

Da Th17-Zellen nicht nur neutrophile Granulozyten aktivieren und somit die Immunabwehr einleiten, sondern auch eine große Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen, werden in diesem Kapitel die Th17-spezifischen Zytokine analysiert. Während IL-6 die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu Th17-Zellen fördert, werden IL-17 und IL-22 von diesen produziert [22, 96-100].

Das für die Th17-Zellen namensgebende Zytokin IL-17 weist unterschiedliche Konzentrationen in den Kohorten auf. Im unstimulierten Ansatz zeigen sich im Vergleich zu HD bei EM durchschnittlich mehr als dreifach und bei LS durchschnittlich mehr als zweifach so hohe Werte. Auch nach Stimulation mit IAA und IA2 liegen die Konzentrationen von IL-17 bei EM und LS über denen von HD. Bei IA2 produzieren die PBMCs der EM signifikant mehr IL-17 als die der LS ( $p=0,048$ ). Trotzdem sind die Werte bei EM in bei beiden Ansätzen kleiner als im unstimulierten Ansatz. Die HD haben hingegen nach Stimulation mit GAD65 und *Candida albicans* höhere IL-17-Werte als im unstimulierten Ansatz und in Summe



in diesen Ansätzen höhere Werte als die EM. Die durchschnittlich höchsten Werte der IL-17-Produktion zeigen sich in allen drei Kohorten nach Stimulation mit *Candida albicans* mit einem maximalen Mittelwert von 1295,4 pg/ml bei den LS.

Die Analyse der IL-22-Produktion ergibt, dass die HD und EM nach Stimulation mit GAD65 und IAA durchschnittlich höhere Werte aufweisen als im unstimulierten Ansatz, während die LS nach Stimulation mit GAD65 niedrigere Konzentrationen aufweisen. Auffallend ist, dass sich die Konzentrationen von IL-22 zwischen HD und EM lediglich nach Stimulation mit *Candida albicans* stark unterscheiden. Dies beruht, wie in Tabelle 39 ersichtlich, auf den großen interindividuellen Unterschieden in der EM Kohorte. Bei allen anderen Ansätzen liegen die Werte eng beieinander. Nach Stimulation mit einem der Antigene ist bei LS die Konzentration von IL-22 kleiner als im unstimulierten Ansatz.

Da sowohl bei IL-17 als auch bei IL-22 die Werte nicht im linearen Bereich der Sigmakurve liegen, sind die Ergebnisse kritisch zu betrachten. Außerdem zeigen sich bei beiden Zytokine bei der Stratifizierungsanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten.

Die absoluten Werte der IL-6 Konzentrationen sind zu hoch, da diese außerhalb des linearen Sigmabereichs liegen. Da das Probenvolumen für eine weitere Messung zu gering war, konnte keine Verdünnungsreihe erstellt werden. Trotzdem ist zu beobachten, dass nach Stimulation mit GAD65 und IA2 die Konzentrationen von IL-6 bei EM deutlich kleiner sind als bei HD und LS. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen EM und LS nach Stimulation mit IA2 ( $p=0,010$ ). Während die Produktion von IL-6 bei HD und LS nach Stimulation mit GAD65, IA2 und *Candida albicans* im Vergleich zur unstimulierten Probe deutlich größer ist, ist sie bei EM lediglich nach Stimulation mit *Candida albicans* höher. Die durchschnittlichen Konzentrationen von IL-6 ähneln sich in allen drei Kohorten nach Stimulation mit IAA. Die Daten sind deskriptiv in Tabelle 39 dargestellt. Bei der Stratifizierung mit dem Cut-off auf Höhe der 75. Perzentile (69594,0 pg/ml) ergeben sich, wie in den Kreuztabellen 40 und 41 ersichtlich, signifikante Unterschiede zwischen HD und EM ( $p=0,02$ ) und EM und LS

(p=0,01). Die graphischen Daten der Zytokine IL-17, IL-22 und IL-6 sind der Abbildung 37 zu entnehmen.

Th17-Zytokine	HD (N=3)		EM (N=7)		LS (N=5)		p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	
<b>IL-17</b>							
Unstimuliert	121,5 ± 114,5	137,1; 0,0-227,4	384,7 ± 293,9	462,9; 0,0-816,3	281,9 ± 201,3	227,4; 0,0-491,7	0,530
GAD65	357,7 ± 130,8	433,2; 206,7-433,2	201,6 ± 167,7	303,1; 0,0-370,8	269,6 ± 218,3	227,4; 0,0-491,7	0,639
IAA	292,1 ± 96,2	320,7; 184,9-370,8	350,7 ± 188,6	337,8; 0,0-625,7	345,0 ± 148,3	386,9; 110,1-491,7	1,000
IA2	72,2 ± 68,8	79,6; 0,0-137,1	231,0 ± 124,7	227,4; 79,6-433,2	98,2 ± 83,9	79,6; 0,0-184,9	<b>0,048</b>
Candida albicans	897,7 ± 1121,1	370,8; 137,1-2185,1	700,6 ± 445,7	650,8; 79,6-1260,3	1295,4 ± 1912,0	303,1; 247,3-4676,8	0,876
<b>IL-22</b>							
Unstimuliert	8548,1 ± 7403,0	12781,0; 0,0-12863,2	9183,1 ± 6273,4	12830,5; 0,0-12930,5	10331,3 ± 5775,5	12889,0; 0,0-12973,6	0,202
GAD65	12829,8 ± 81,2	12863,2; 12737,2-12889,0	11002,4 ± 4853,0	12830,5; 0,0-12965,4	7698,2 ± 7927,6	12762,2; 0,0-12889,0	0,343
IAA	11063,7 ± 4879,3	12925,7; 0,0-13012,3	11063,7 ± 4879,3	12925,7; 0,0-13012,3	10257,3 ± 5734,2	12796,3; 0,0-12900,3	0,202
IA2	4200,7 ± 7275,8	0,0; 0,0-12602,1	3636,9 ± 6211,5	0,0; 0,0-12855,9	5120,1 ± 7011,1	0,0; 0,0-12863,2	0,639
Candida albicans	12602,1 ± 0,0	12602,1; 12602,1-12602,1	5500,3 ± 6860,2	0,0; 0,0-12930,4	7750,8 ± 7977,7	12737,2; 0,0-13207,4	0,639
<b>IL-6</b>							
Unstimuliert	26796,4 ± 37359,8	10091,0; 704,2-69594,0	18004,4 ± 25535,8	7182,2; 69,5-69594,0	14080,4 ± 12817,5	17671,7; 618,3-29445,9	0,876
GAD65	48223,7 ± 37014,4	69594,0; 5483,2-69594,0	8955,1 ± 7599,7	8054,8; 652,0-22927,3	46477,0 ± 32484,4	69594,0; 1482,5-69594,0	0,073
IAA	14208,3 ± 25242,3	2381,5; 84,6-69594,0	14208,3 ± 25242,3	2381,5; 84,6-69594,0	15768,6 ± 18745,8	19708,5; 918,5-69594,0	0,432
IA2	51628,9 ± 27460,5	65274,3; 20018,5-69594,0	15050,6 ± 11821,5	11602,3; 935,5-35305,8	60170,7 ± 21071,1	69549,0; 22477,6-69594,0	<b>0,010</b>
Candida albicans	69594,0 ± 0,0	69594,0; 69594,0-69594,0	32791,9 ± 28297,0	19343,9; 1236,0-69594,0	49095,6 ± 28071,3	69594,0; Oka 17796,2-69594,0	0,343

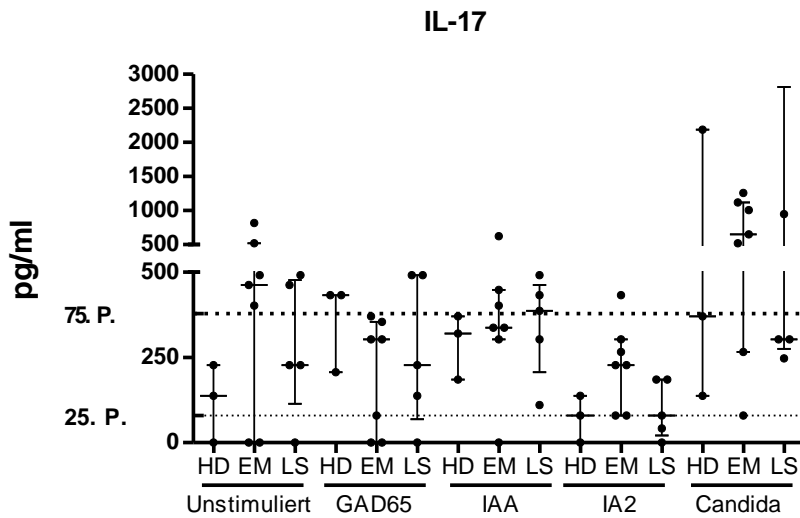
Tabelle 39: Durchschnittliche Konzentration der Th17-spezifischen Zytokine IL-17, IL-22 und IL-6 in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS. Der p-Wert bezieht sich auf die Mittelwerte der EM und LS und wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Bei Werten gleich 0 liegt die Konzentration unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), T-Helferzelle (Th), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

IL-6	HD	EM	p-Wert
Low to mediate level IL-6	4	20	0,02
High level IL-6	5	1	
Insgesamt	9	21	

Tabelle 40: Stratifizierung der Werte in low to mediate level IL-6 und high level IL-6 Gruppen mithilfe des Cut-off auf Höhe der 75. Perzentile. In dieser Tabelle ist der signifikante Unterschied zwischen HD und EM dargestellt. Der p-Wert wurde mit dem Fisher's Exacta Test berechnet. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Interleukin (IL)

IL-6	EM	LS	p-Wert
Low to mediate level IL-6	20	7	0,01
High level IL-6	1	8	
Insgesamt	21	15	

Tabelle 41: Stratifizierung der Werte in low to mediate level IL-6 und high level IL-6 Gruppen mithilfe des Cut-off auf Höhe der 75. Perzentile. In dieser Tabelle ist der signifikante Unterschied zwischen EM und LS dargestellt. Der p-Wert wurde mit dem Fisher's Exacta Test berechnet. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Interleukin (IL)



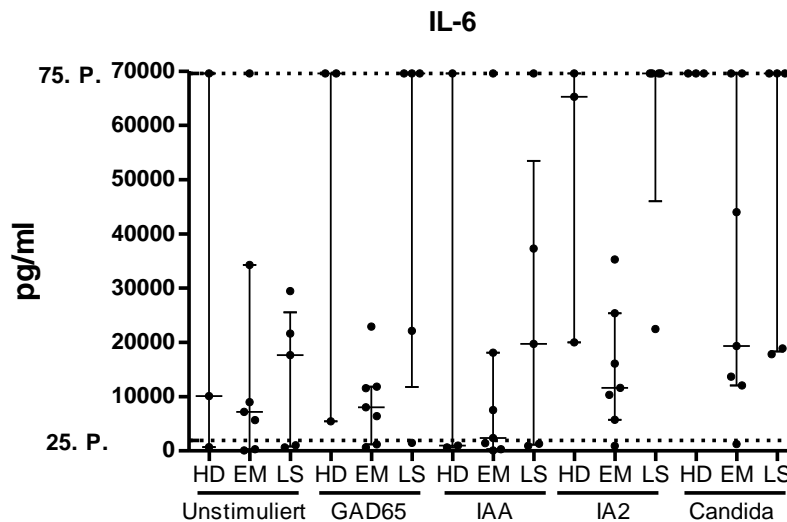
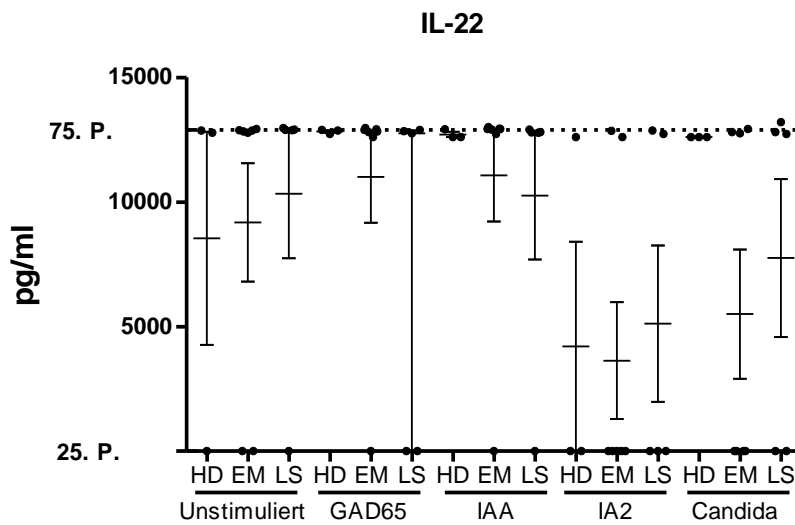


Abbildung 37: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IL-17, IL-22, IL-6 mit dem Median und der Interquartilsabstände. Auf der x-Achse sind die HD, EM und LS in den verschiedenen Ansätzen aufgeführt. Die y-Achse zeigt die Konzentrationen der einzelnen Zytokine und die Cut-offs auf Höhe der 25. und 75. Perzentile an. Abkürzungen: Interleukin (IL), Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Pikogramm (pg), Milliliter (ml), Perzentile (P)

### 3.5.3. Treg-spezifische Zytokine

Die regulatorischen T-Zellen haben die Aufgabe, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken. Sie regulieren die Selbsttoleranz des Immunsystems und verhindern dadurch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Regulatorische T-Zellen exprimieren konstitutiv den IL-2-Rezeptor (CD25 $\alpha$ ) und benötigen IL-2 um ihre Funktion aufrechtzuerhalten.

IL-10 hingegen wird in der zellvermittelten Immunantwort von regulatorischen T-Zellen produziert um die IFN- $\gamma$  Produktion zu hemmen [22, 101-103].

Die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 ist im unstimulierten Ansatz bei HD um ein Vielfaches höher als bei EM und LS. Wie in Tabelle 42 und Abbildung 38 zu sehen, ist die Konzentration von IL-10 bei HD nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* kleiner als im unstimulierten Ansatz. Während die EM nach Stimulation mit GAD65 und *Candida albicans* mehr IL-10 produzieren als die HD und die LS, ist die Produktion von IL-10 nach Stimulation mit IAA bei den LS höher als bei HD und EM. Signifikante Unterschiede sind nicht vorhanden. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz produzieren die EM nach Stimulation mit GAD65 durchschnittlich mehr IL-10 und die LS nach Stimulation mit IAA.

Treg-Zytokine	HD (N=3)		EM (N=7)		LS (N=5)		p-Wert EM-LS
	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	Mittelwert $\pm$ SD	Median; Min-Max	
<b>IL-10</b>							
Unstimuliert	624,9 $\pm$ 835,7	142,4; 142,4-1589,9	185,6 $\pm$ 105,5	187,7; 0,0-293,3	198,7 $\pm$ 134,8	198,7; 31,8-377,3	1,000
GAD65	210,3 $\pm$ 59,7	204,2; 153,9-272,8	222,2 $\pm$ 276,8	136,5; 5,2-784,5	135,5 $\pm$ 97,9	142,4; 23,8-278,0	1,000
IAA	195,3 $\pm$ 70,1	176,6; 136,5-272,8	186,5 $\pm$ 140,9	142,4; 61,0-485,8	234,5 $\pm$ 343,1	136,5; 0,0-826,6	0,755
IA2	60,7 $\pm$ 105,2	0,0; 0,0-182,2	132,3 $\pm$ 148,2	106,4; 0,0-401,4	116,4 $\pm$ 83,5	118,6; 31,8-198,7	0,833
<i>Candida albicans</i>	59,2 $\pm$ 82,9	23,8; 0,0-153,9	156,7 $\pm$ 279,1	54,0; 0,0-784,5	107,6 $\pm$ 173,3	39,5; 0,0-410,9	0,639
<b>IL-2</b>							
Unstimuliert	514,7 $\pm$ 448,0	727,3; 0,0-816,8	471,6 $\pm$ 410,5	488,4; 0,0-1094,1	737,5 $\pm$ 491,7	816,8; 0,0-1352,8	0,343
GAD65	449,7 $\pm$ 393,0	621,9; 0,0-727,3	612,0 $\pm$ 461,2	727,3; 0,0-1256,8	453,3 $\pm$ 434,1	621,9; 0,0-967,4	0,432
IAA	298,6 $\pm$ 517,2	0,0; 0,0-895,9	694,4 $\pm$ 513,3	727,3; 0,0-1544,2	549,8 $\pm$ 533,7	621,9; 0,0-1094,1	0,639
IA2	0,0	0,0	291,3 $\pm$ 337,8	279,8; 0,0-857,5	0,0	0,0	0,106
<i>Candida albicans</i>	162,8 $\pm$ 282,0	0,0; 0,0-488,4	330,3 $\pm$ 414,2	0,0; 0,0-857,5	56,0 $\pm$ 125,1	0,0; 0,0-279,8	432

Tabelle 402: Durchschnittliche Konzentration der Treg-spezifischen Zytokine IL-10 und IL-2 in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS. Der p-Wert bezieht sich auf die Mittelwerte der EM und LS und wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Bei Werten gleich 0 liegt die Konzentration unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), T-Helferzelle (Th), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)

Bei Betrachtung der IL-2-Werte zeigt sich, dass die Konzentration im unstimulierten Ansatz bei HD und LS größer ist als nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen und als im unstimulierten Ansatz von EM. Nach Stimulation mit IA2 liegen alle Konzentrationen von HD und LS unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu ist die durchschnittliche Konzentration von IL-2 bei EM nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* größer als im unstimulierten Ansatz und erreicht Höchstwerte nach Stimulation mit GAD65 und IAA.

Auch die IL-2 Konzentrationen liegen nicht im linearen Bereich der Sigmakurve und sind deshalb kritisch zu betrachten.

Die Produktion der Treg-spezifischen Zytokine in den verschiedenen Kohorten unterscheidet sich auch nach Stratifizierung nicht signifikant voneinander.

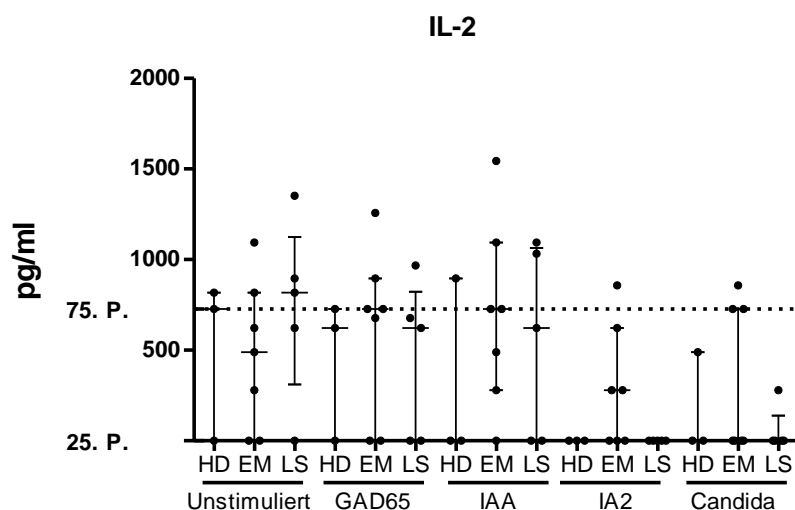
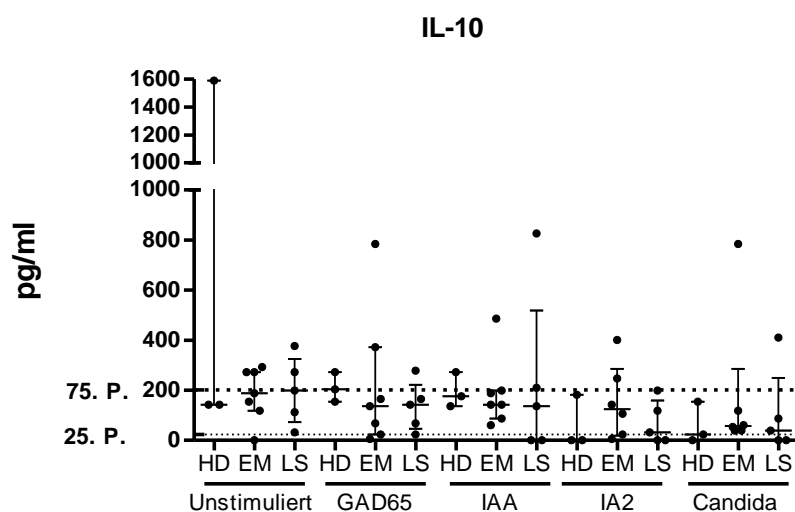


Abbildung 38: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IL-10 und IL-2 mit dem Median und der Interquartilsabstände. Auf der x-Achse sind die HD, EM und LS in den verschiedenen Ansätzen aufgeführt. Die y-Achse zeigt die Konzentrationen der einzelnen Zytokine und die Cut-offs auf Höhe der 25. und 75. Perzentile an. Abkürzungen: Interleukin (IL), Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Pikogramm (pg), Milliliter (ml), Perzentile (P)

### 3.5.4. Th2-spezifische Zytokine

Dieses Unterkapitel beschreibt die Th2-spezifischen Zytokinkonzentrationen von IL-4, IL-5 und IL-13. Das von Mastzellen und Th2-Zellen produzierte IL-4 fördert und verbessert die Th2-Differenzierung. Zusätzlich produzieren die Th2-Zellen ihrerseits IL-5 und IL-13. Diese Zytokine spielen mithilfe von Eosinophilen und

Mastzellen eine bedeutsame Rolle bei der Bekämpfung von Helminthen [22, 104, 105].

Th2-Zytokine	HD (N=3)		EM (N=7)		LS (N=5)		p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	Mittelwert ± SD	Median; Min-Max	
<b>IL-4</b>							
Unstimuliert	310,5 ± 98,5	306,3; 214,2-411,1	405,4 ± 286,7	441,2; 0,0-756,1	464,7 ± 304,4	658,8; 0,0-679,2	0,755
GAD65	380,4 ± 330,3	547,2; 0,0-594,0	425,5 ± 116,3	411,1; 306,3-637,8	325,2 ± 286,6	306,3; 44,0-637,8	0,530
IAA	254,2 ± 402,8	44,0; 0,0-718,6	420,5 ± 306,3	522,4; 0,0-792,2	257,2 ± 214,1	214,2; 0,0-594,0	1,000
IA2	14,7 ± 25,4	0,0; 0,0-44,0	372,0 ± 230,9	373,8; 44,0-679,2	344,3	344,3; 344,3-344,3	1,000
Candida albicans	116,8 ± 165,6	44,0; 0,0-306,3	300,4 ± 302,7	344,3; 0,0-678,2	85,7 ± 117,3	0,0; 0,0-214,2	0,268
<b>IL-5</b>							
Unstimuliert	124,5 ± 112,0	156,4; 0,0-217,1	198,0 ± 120,7	254,6; 0,0-358,3	137,0 ± 131,5	177,3; 0,0-290,5	0,432
GAD65	87,9 ± 88,7	86,4; 0,0-177,3	192,3 ± 59,0	177,3; 134,4-290,5	110,8 ± 124,4	86,4; 0,0-290,5	0,268
IAA	164,3 ± 214,1	86,4; 0,0-406,5	224,2 ± 138,5	134,4; 58,9-390,6	128,4 ± 129,6	134,4; 0,0-290,5	0,202
IA2	89,6 ± 77,6	134,4; 0,0-134,4	217,1	217,1; 217,1-217,1	86,4	86,4	1,000
Candida albicans	0,0	0,0	99,7 ± 162,9	0,0; 0,0-422,2	17,3 ± 38,6	0,0; 0,0-42,2	0,530
<b>IL-13</b>							
Unstimuliert	288,8 ± 280,6	305,9; 0,0-560,4	889,5 ± 1435,9	366,0; 0,0-4110,7	374,5 ± 335,0	289,6; 0,0-901,2	0,639
GAD65	331,5 ± 23,4	336,9; 305,9-351,7	698,8 ± 449,2	516,5; 305,9-1480,5	462,8 ± 715,7	236,4; 0,0-1711,7	0,202
IAA	447,7 ± 493,6	366,0; 0,0-977,1	503,7 ± 666,7	336,9; 0,0-1919,9	255,7 ± 308,0	236,4; 0,0-752,7	0,432
IA2	0,0	0,0	133,7 ± 172,9	0,0; 0,0-393,7	297,1 ± 34,6	297,1; 272,6-321,6	0,333
Candida albicans	200,8 ± 185,6	236,4; 0,0-366,0	316,4 ± 332,1	336,9; 0,0-845,5	424,1 ± 512,4	420,2; 0,0-1254,9	1,000
<b>IL-9</b>							
Unstimuliert	33,2 ± 1,9	32,2; 32,1-35,4	31,4 ± 22,0	32,2; 0,0-57,5	35,3 ± 21,7	42,0; 0,0-57,5	0,876
GAD65	29,3 ± 16,5	22,4; 17,3-48,0	30,1 ± 20,3	32,2; 0,0-57,5	32,7 ± 10,9	35,4; 15,6-41,8	0,876
IAA	25,7 ± 22,3	38,6; 0,0-38,6	34,8 ± 13,5	32,2; 19,0-60,6	38,7 ± 19,5	32,2; 25,7-72,8	0,876
IA2	21,1 ± 9,7	17,3; 13,9-32,2	27,9 ± 16,4	28,9; 0,0-54,3	14,0 ± 14,8	15,6; 0,0-35,4	0,202
Candida albicans	28,2 ± 14,0	25,7; 15,6-43,4	10,4 ± 10,1	15,6; 0,0-24,0	17,1 ± 13,0	15,6; 0,0-35,4	0,530

Tabelle 413: Durchschnittliche Konzentration der Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und dem Zytokin IL-9 in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS. Der p-Wert bezieht sich auf die Mittelwerte der EM und LS und wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Bei Werten gleich 0 liegt die Konzentration unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze. Abkürzungen: Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), T-Helferzelle (Th), Minimum (Min), Maximum (Max), Standardabweichung (SD)



Die durchschnittliche Produktion des Th2-Zytokins IL-4 ist im unstimulierten Ansatz bei EM und LS höher als bei HD. Tabelle 43 zeigt, dass es in diesem Ansatz bei den Diabeteskohorten große interindividuelle Unterschiede. Die Konzentrationen von IL-4 sind auch bei allen anderen Ansätzen bei EM höher als bei HD und LS. Besonders große Unterschiede bestehen nach Stimulation mit IA2 und *Candida albicans*. Die HD zeigen nach Stimulation mit GAD65 und *Candida albicans* durchschnittlich höhere IL-4 Werte als die LS.

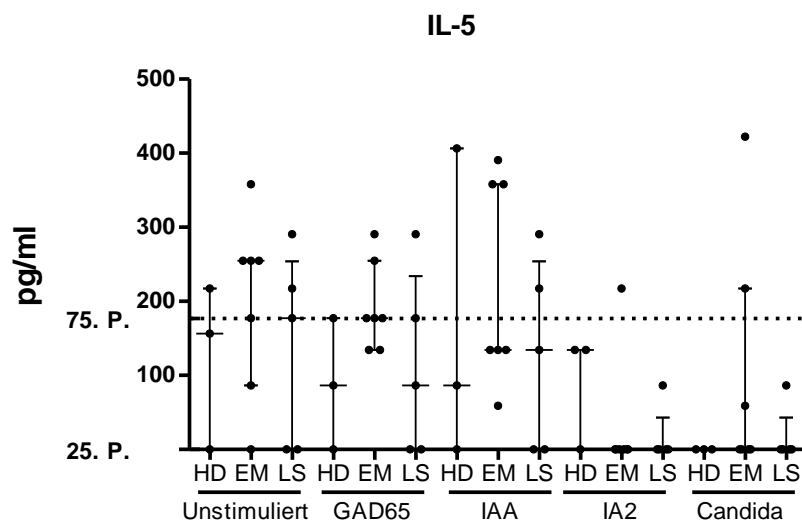
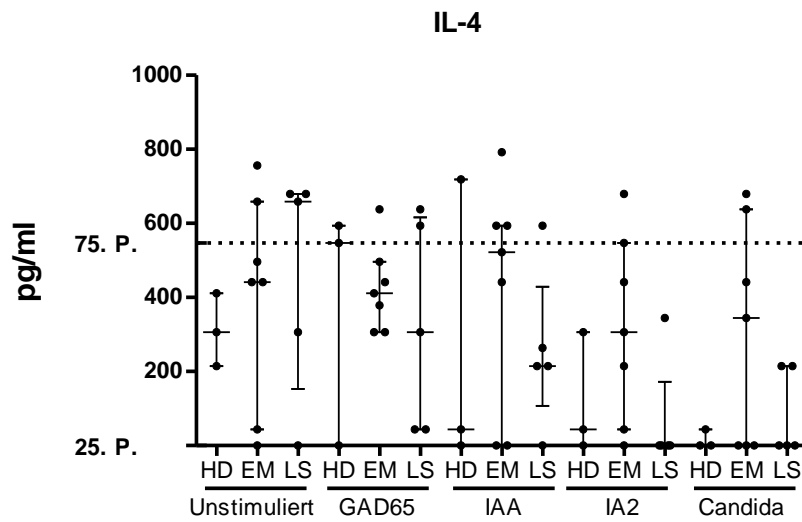
Auch die durchschnittliche Konzentration von IL-13 ist bei EM in allen Ansätzen höher als bei HD und LS. Besonders große Unterschiede zwischen HD und EM bestehen im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit GAD65. Während bei EM die Produktion von IL-13 im unstimulierten Ansatz höher ist als bei den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans*, zeigt sich bei HD eine Erhöhung der Konzentration nach Stimulation mit GAD65 und IAA und bei LS nach Stimulation mit GAD65 und *Candida albicans* im Vergleich zum unstimulierten Ansatz. Tabelle 43 und Abbildung 39 stellen dar, dass bei HD die Stimulation von IA2 zu IL-13-Konzentrationen unter die Nachweisgrenze führt, wohingegen bei LS in diesem Ansatz nahezu so viel produziert wird wie im unstimulierten Ansatz.

Da es bei der Messung von IL-5 vermehrt Werte gibt, die nicht im linearen Bereich der Sigmakurve liegen, wird in diesem Fall auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet. Die absoluten Konzentrationen können Tabelle 43 und Abbildung 39 entnommen werden.

Bei der Untersuchung von IL-9 fällt auf, dass die Mittelwerte der Konzentrationen im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit GAD65 in den drei Kohorten und beiden Ansätzen annähernd gleich sind. Nach Stimulation mit IAA ist die durchschnittliche Konzentration bei HD kleiner als im unstimulierten Ansatz, während sie bei EM und LS größer ist. Des Weiteren zeigt sich in Tabelle 43 und Abbildung 39, dass nach Stimulation mit IA2 die Werte bei HD und LS kleiner sind als im unstimulierten Ansatz und als bei EM. Bei *Candida albicans* hingegen, halbieren beziehungsweise dritteln sich die Werte im Vergleich zum

unstimulierten Ansatz bei LS und EM, während sie bei HD annähernd gleichbleiben.

Auch hier zeigen sich nach der Stratifizierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten.



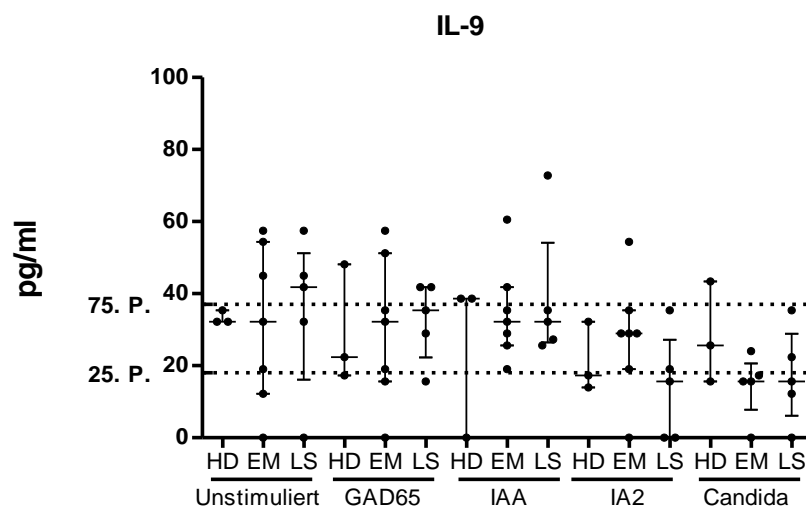
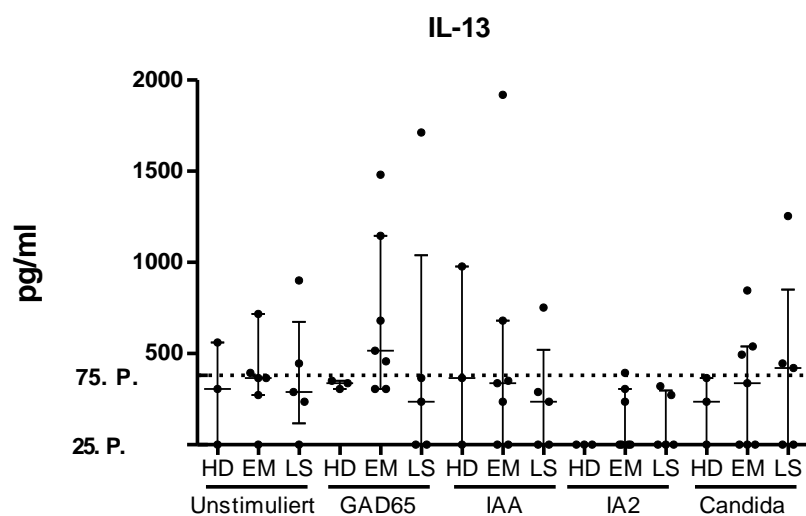


Abbildung 39: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-9 mit dem Median und der Interquartilsabstände. Auf der x-Achse sind die HD, EM und LS in den verschiedenen Ansätzen aufgeführt. Die y-Achse zeigt die Konzentrationen der einzelnen Zytokine und die Cut-offs auf Höhe der 25. und 75. Perzentile an. Abkürzungen: Interleukin (IL), Gesunde (HD), Erstmanifestation (EM), Langzeiterkrankte (LS), Glutamat-Decarboxylase (GAD), Humanes Insulin-Antigen (IAA), Tyrosinphosphatase (IA2), Pikogramm (pg), Milliliter (ml), Perzentile (P)

## **4. Diskussion**

Es gibt bereits viele Studien, die zeigen, dass sowohl CD4+- als auch CD8+-T-Zellen für die Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas verantwortlich sind. Da entdeckt wurde, dass bestimmte HLA-2-Moleküle bei der Entwicklung von T1DM beteiligt sind, lag die Konzentration lange Zeit auf den CD4+-T-Zellen [106, 107]. Neuere Studien jedoch zeigten, dass auch HLA-1-Moleküle als unabhängiger Risikofaktor bei der Entstehung des T1DM eine bedeutsame Rolle spielen und deuten auf die Wichtigkeit der Untersuchung der zytotoxischen CD8+-T-Zellen hin [108-111]. Da außerdem bekannt ist, dass die Autoimmunreaktion gegen Autoantigene wie Insulin, GAD65 und IA2 gerichtet ist, untersucht unsere Studie zusätzlich zu den CD4+- und CD8+-T-Zellen im unstimulierten Ansatz auch die Reaktion dieser Zellen nach Stimulation mit diesen diabetesspezifischen Antigenen [112-114].

Interessanterweise gibt es verschiedene Interpretationen der T-Zell-Reaktion nach Stimulation mit diesen Antigenen. Manche Studien postulieren, dass unabhängig vom Krankheitsstatus die Reaktion der T-Zellen auf die Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen gering ist und die Hintergrundreaktion nicht übersteigt [115, 116], während andere behaupten, dass die T-Zell- und Zytokinreaktion nach Stimulation erhöht ist [117]. Zu beachten ist, dass die Untersuchungen unterschiedliche Versuchsansätze hatten, Probanden unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Herkunft untersuchten und verschiedene Antigene benutzt haben.

### **4.1. Th-Subpopulationen**

#### **4.1.1. CD4-positive Th-Subpopulationen**

Bei Betrachtung der CD4+-T-Zellen erkennt man, dass in allen Ansätzen bei EM durchschnittlich deutlich mehr CD4+-T-Zellen proliferieren als bei HD und LS. Im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit *Candida albicans* ist dieser Unterschied zwischen HD und EM signifikant, während es nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kohorten gibt. Interessanterweise sind die interindividuellen

Unterschiede bei EM deutlich größer als bei HD und LS, was dafürspricht, dass einzelne erstmanifestierte T1DM Patienten sehr starke Proliferationen aufweisen. Durch die Untersuchung der Ratiowerte konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass nach Stimulation mit GAD65 vier EM mit einer positiven Proliferation auf den Stimulus reagiert haben, während bei HD keiner und bei LS lediglich ein Proband positiv reagiert hat. Auch im unstimulierten Ansatz weisen mehr EM eine positive Proliferation auf als HD und LS (vier EM vs. null HD und ein LS). Dass die durchschnittliche Proliferation nach Stimulation mit den Antigenen bei HD und LS kleiner ist als bei EM, könnte darauf zurück zu führen sein, dass im Falle von HD in vivo kein Priming stattgefunden hat und bei LS die Immunreaktion schon länger zurück liegt. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die T-Zellen der HD eine Toleranz gegenüber diesen Antigenen aufweisen und die autoreaktiven T-Zellen der LS bereits abgestorben sind. Wie auch in einer Studie von Arif et al, konnte trotzdem eine geringe Menge von spezifischen autoreaktiven CD4+-T-Zellen bei HD nachgewiesen werden [118].

Jedoch ist zu erwähnen, dass die Proliferationsrate sich zwischen dem unstimulierten Ansatz und den diabetesspezifischen Antigenen nicht unterscheidet. Neben der in vivo Messung, könnte die Untersuchung der CD4+-T-Zellen in der Peripherie und nicht in der Nähe der Autoimmunreaktion im Pankreas als Ursache in Betracht kommen [119]. Wie Mannering et al. [116] beschrieben, ist außerdem die Häufigkeit von Inselantigen-spezifischen CD4+-T-Zellen im Blut sehr gering und es ist im Voraus schwierig herauszufinden, bei welchen Patienten welches Antigen für die pathogene Autoimmunreaktion verantwortlich ist. Durch Untersuchung der Korrelation zwischen Autoantikörpertiter und der proliferierenden Ag-spezifischen CD4+-T-Zellen konnte auch in dieser Arbeit kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

Es wäre zukünftig interessant, die Zytokinproduktion und die Transkriptionsfaktoren der CD4+-T-Zellen nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen zu untersuchen, da diesen in Voruntersuchungen eine stärkere proinflammatorische Reaktion nachgesagt wird [120].

In einem Review von Varela-Calvino et al. beschrieben diese, dass es T-Zell-Reaktionen auf diabetesspezifische Antigene sowohl bei Gesunden als auch bei T1DM Patienten gibt, diese sich jedoch anhand des Phänotyps der Subpopulationen unterscheiden lassen. Während die T1DM Patienten mehr autoreaktive CD4+-T-Zellen aufwiesen, zeigten die Gesunden mehr regulatorische CD4+-T-Zellen [121]. Bei Betrachtung der CD4+-Subpopulationen zeigt sich, dass sich die Proportionen bei den drei Kohorten durch Stimulation mit den spezifischen Antigenen verändern. Während der proportionale Anteil der naiven T-Zellen durch Stimulation bei EM kleiner ist als im unstimulierten Ansatz, bleibt dieser bei HD tendenziell gleich oder ist größer. Hervorzuheben ist außerdem, dass der Anteil der proliferierten CD4+CD45RA-CD28-T-Effektorzellen durch Stimulation mit den Antigenen bei EM überall deutlich größer ist als im unstimulierten Ansatz, wohingegen bei HD und LS die Werte gleichbleiben oder nur in Ausnahmefällen kleiner sind. Da diese Effektor-T-Zell-Subpopulation proinflammatorische Funktionen aufweist [122], wäre es wichtig durch weitere Untersuchungen herauszufinden inwiefern der erhöhte proportionale Anteil nach Stimulation mit GAD65 bei der Entstehung des T1DM eine Rolle spielen könnte. Interessanterweise konnten aber keine erhöhten proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen (z.B. IFN- $\gamma$ , IL-17) der peripheren Gesamtymphozyten nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen bei EM im Gegensatz zu HD oder LS nachgewiesen werden. Es ist also wichtig die Zytokinproduktion einzelner Subpopulationen, wie zum Beispiel der T-Effektorzellen, nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen bei EM zu untersuchen, um herauszufinden, ob sie auf die Stimuli mit einer Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine reagieren.

Besonderes Augenmerk gilt den proliferierten CD4+CD25+-Treg-Zellen. Diese sind im unstimulierten Ansatz bei HD größer als bei EM und LS. Nach Stimulation mit GAD65, IA2 und *Candida albicans* ändert sich das Verhältnis und der Anteil der Treg-Zellen ist bei EM höher als bei HD und LS. Vergleicht man die Daten mit Untersuchungen aus der Vergangenheit, zeigt sich, dass die Ergebnisse der quantitativen Analyse der CD4+CD25+-T-Zellen auseinander gehen. Viele Studien postulieren, dass es im Rahmen einer unspezifischen Stimulation mit

CD3 und CD28 oder keiner Stimulation keine Unterschiede der Treg-Zellen zwischen HD und T1DM Patienten gibt [123-125]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sich die Funktion dieser regulatorischen Zellen durch eingeschränkte Suppressionsfähigkeit oder unterschiedliche Zytokinproduktion zwischen Gesunden und T1DM Patienten unterscheidet [123]. Da nTregs außerdem die Fähigkeit haben, autoreaktive T-Zellen mit ähnlicher Antigen-Spezifität zu hemmen, indem sie das Autoantigen binden, gilt es herauszufinden, ob diese Bindung sich bei T1DM Patienten und Gesunden unterscheidet. Es wäre zukünftig also interessant weitere Untersuchungen über die Subpopulation der proliferierten CD4+CD25+-T-Zellen durchzuführen, da es nach unserem Kenntnisstand keine Studien über die Auswirkung der diabetesspezifischen Antigene auf die Funktion der Treg-Zellen bei EM, LS und HD gibt.

Mit Blick auf die proliferierten CD4+CD161+-Th17-Zellen fällt auf, dass der durchschnittliche prozentuale Anteil im unstimulierten Ansatz bei HD fast doppelt so groß ist als bei den T1DM Kohorten. Auffallend ist, dass die Stimulation mit GAD65 die Differenzierung zu Th17-Zellen bei EM vorantreibt, sodass sich der Anteil dieser Zellen im Vergleich zum unstimulierten Ansatz verdoppelt. Gleichzeitig halbiert sich dieser bei HD. Da durch viele Studien nachgewiesen ist, dass die Th17-Zellen bei der Pathogenese der T1DM eine große Rolle spielen, sind diese Ergebnisse besonders relevant und deuten darauf hin, dass GAD65 bei der durch Th17-Zellen geförderten Autoimmunreaktion involviert ist [126, 127]. Nach Stimulation mit IA2 weisen alle drei Kohorten deutlich höhere durchschnittliche Werte auf als im unstimulierten Ansatz, unterscheiden sich jedoch nicht stark voneinander. Obwohl CD161 ein Marker für die IL-17-produzierenden Th17-Zellen ist [128], gibt es wenige Untersuchungen über die Rolle dieser Subpopulation bei der Entstehung des T1DM. Die meisten bisher durchgeführten Studien beziehen sich auf andere Subpopulationen und deren IL-17 Produktion bei T1DM im Vergleich zu Gesunden [129, 130].

#### 4.1.2. CD8-positive Th-Subpopulationen

In den 1980er und 1990er Jahren zeigten bereits mehrere Studien eine erhöhte Expression von HLA-1-Molekülen auf Inselzellen von T1DM Patienten, was auf eine erhöhte Anfälligkeit der CD8+-T-Zell-vermittelten Zelltötung hinwies [131, 132]. Nachdem die beteiligten Prozesse lange Zeit unklar blieben, bewiesen Coppieters et al. [133] 2012 erstmalig, dass bei erstmanifestierten und langzeiterkrankten T1DM Patienten autoimmune, insel-reaktive CD8+-T-Zellen die Inseln des Pankreas infiltrieren und bei der Zerstörung der Beta-Zellen beteiligt sind.

Aufgrund der Bedeutsamkeit dieser autoreaktiven CD8+-T-Zellen ist es wichtig diese als potenziellen Biomarker für immunvermittelte Schäden im peripheren Blut zu untersuchen. Bereits 1995 fanden Panina-Bordignon et al. heraus [134], dass GAD-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten bei präklinischem und erstmanifestierten T1DM Patienten autologe APCs abtöteten. Darauf aufbauend erzeugten Knight et al. [135] GAD65-spezifische CD8+-T-Zellkone und zeigten, dass durch die Erkennung von GAD65 gezielt menschliche Inselzellen zerstört werden konnten. Bei Betrachtung des durchschnittlichen prozentualen Anteils der proliferierten CD8+-T-Zellen an den Lymphozyten zeigt sich in dieser Studie bei allen Ansätzen, dass die T1DM Kohorten mehr dieser Zellen aufweisen als HD. Besonders starke Unterschiede zwischen HD und EM ergeben sich nach Stimulation mit GAD65 und *Candida albicans*. Dies zeigt, dass die CD8+-T-Zellen bei EM verstärkt auf GAD65 reagieren und deutet daraufhin, dass es bei einzelnen erstmanifestierten T1DM Patienten im peripheren Blut Hinweise auf die Beteiligung spezifischer CD8+-T-Zellen bei der Entstehung des T1DM geben könnte.

Während sich auch im unstimulierten Ansatz ein höherer Median bei EM als bei HD zeigt, besteht nach Stimulation mit IA2 kein Unterschied zwischen EM und HD. Ähnliche Ergebnisse lieferten Takahashi et al. [136], die zeigten, dass nach Stimulation mit IA2 bei Hochrisikopatienten als auch bei HD die gleiche Anzahl an spezifischen autoreaktiven T-Zellen vorhanden waren. Interessanterweise



besteht in dieser Studie jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen HD und LS nach Stimulation mit IA2. Vergleichbare Studien liegen bislang nicht vor.

Um die Beta-Zell-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und deren Differenzierung genauer zu betrachten untersuchten Skowera et al. [137] nicht nur die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, sondern ebenso bestimmte Subpopulationen. Sie fanden heraus, dass der prozentuale Anteil der spezifischen autoreaktiven CD8-T-Zellen bei EM und HD in der Peripherie ähnlich waren, sich die Subpopulationen jedoch unterschieden. Sie zeigten, dass die T1DM Patienten weniger natürliche CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CD27<sup>+</sup>CD34<sup>RO</sup>-CD57-CD95-CCR7<sup>+</sup>) aufwiesen, jedoch mehr der Stammzellgedächtnis CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CD27<sup>+</sup>CD45<sup>RO</sup>-CD95<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>).

Die Unterteilung der Subpopulationen in dieser Studie wurde anhand der Oberflächenmarker CD45RA und CD28 durchgeführt. Bei Betrachtung der prozentualen Verteilung der proliferierten CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen zeigt sich, dass EM im unstimulierten Ansatz deutlich mehr naive T-Zellen und Gedächtniszellen aufweist und dafür weniger Effektorzellen und TEMRAs als die anderen beiden Kohorten. Bei den TEMRA ist der Unterschied zwischen HD und EM signifikant. Besonders auffallend ist, dass nach Stimulation mit GAD65, IAA und *Candida albicans* die Anzahl der Effektorzellen bei HD und LS im Vergleich zum unstimulierten Ansatz kleiner und bei EM größer sind. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Autoantigene bei EM eine Differenzierung zu Effektorzellen auslösen. Abgesehen von IA2 zeigt sich bei den Gedächtniszellen kaum eine Veränderung der prozentualen Verteilung nach Stimulation mit den Antigenen und auch bei den naiven Zellen verändert sich diese nur leicht nach oben oder unten. Wichtig zu erwähnen ist, dass bei allen Ansätzen der Anteil der CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-TEMRA bei EM deutlich niedriger ist als bei HD und LS. Viele Studien beschreiben, dass CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-T-Zellen eine Suppressorfunktion aufweisen und ein Fehlen dieser Subpopulation bei vielen Autoimmunerkrankungen nachzuweisen ist [138, 139]. Bisherige Untersuchungen über CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-T-Zellen an Jugendlichen aus dem Jahre 2014 [140] und Erwachsenen aus dem Jahre 2010 [141] bestätigen die Ergebnisse unserer Arbeit, dass die Anzahl der CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-T-Zellen bei T1DM Patienten erniedrigt sind. Diese Subpopulation kann die Funktion von APCs

verändern, indem sie die Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf diesen Zellen erhöht und die CD4+-T-Zellproliferation bei einer Immunantwort unterdrückt [142]. All dies deutet daraufhin, dass die CD8+CD28-T-Zellen bei der dysregulierten Autoimmunität des T1DM beteiligt sein könnten.

Kürzlich haben Pellegrino et al. [143] Untersuchungen an CD8+CD25+-T-Zellen bei T1DM und gesunden Kontrollen durchgeführt, da bereits festgestellt wurde, dass diese Zellen unter verschiedenen Bedingungen suppressive Eigenschaften aufweisen können [144, 145]. Pellegrino et al. beschrieben, dass es unter basalen Bedingungen keinen Unterschied in der Häufigkeit der CD8+CD25+-T-Zellen zwischen HD und EM gab, LS jedoch signifikant weniger CD8+CD25+-T-Zellen aufwies als HD. Nach 3- und 5-tägiger Stimulation mit PMA-Ionomycin zeigte sich kein Unterschied der proliferierenden CD8+CD25+-T-Zellen zwischen den drei Kohorten. Im Gegensatz dazu ist in unseren Untersuchungen der durchschnittliche Anteil der proliferierten CD8+CD25-Treg-Zellen in allen Ansätzen bei EM größer als bei HD und LS. Jedoch ist zu erwähnen, dass die einzelnen Werte der Probanden zwischen 0 % und 100 % liegen und es somit große interindividuelle Unterschiede gibt. Dies liegt daran, dass der Anteil der CD8+CD25+-T-Zellen an den Lymphozyten sehr gering ist [144] und somit kleine Unterschiede einen großen prozentualen Unterschied ausmachen. Die größte Differenz zwischen den Mittelwerten von HD und EM besteht nach Stimulation mit IA2 und ist signifikant. Es ist zu erwähnen, dass in unseren Untersuchungen FoxP3 als zusätzlicher Treg-Marker in diesem Zusammenhang in den flowzytometrischen Analysen methodisch bedingt durch die intrazelluläre Anfärbung mit CFSE nicht untersucht werden konnte und sich der Versuchsaufbau in den beiden Studien unterscheidet. Um die Rolle der CD8+CD25+-T-Zellen in der Entwicklung des T1DM besser zu verstehen, gilt es Untersuchungen über dieser Zellart und ihre suppressiven Eigenschaften nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen zu machen.

Bei Betrachtung der proliferierten CD8+CD161+-Th17-Zellen zeigt sich, dass sich die durchschnittliche prozentuale Verteilung zwischen den Kohorten kaum unterscheidet. Auch nach Stimulation mit den Antigenen zeigen sich bei HD und EM Parallelen. Lediglich nach Stimulation mit GAD65 ist der Mittelwert der LS

kleiner als im unstimulierten Ansatz, während der der HD und EM größer ist. Auch bei dieser Subpopulation handelt es sich um eine kleine Untergruppe und somit sind die interindividuellen Unterschiede sehr groß. Die endgültige Funktion dieser Zellen ist noch nicht geklärt, Fergusson et al. [146] beschrieben, dass die CD8+CD161+-T-Zellen sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Funktionen aufweisen und diese von der Höhe der CD161 Expression auf den Zellen abhängt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob es in den verschiedenen Ansätzen und innerhalb der Kohorten Unterschiede in der Höhe der Expression des CD161-Oberflächenmarkers auf diesen Zellen gibt.

Abschließend ist wichtig zu beachten, dass die peripheren CD8+-Subpopulationen nicht unbedingt die gewebelokalisierte Immunzellumgebung widerspiegeln. Die histopathologischen Untersuchungen von Beta-zellspezifischen CD8+-T-Zellsubpopulationen im entzündeten Pankreasgewebe der T1DM Patienten, die kurz vor dem Zeitpunkt der Diagnose starben, zeigten eine ausgeprägte Variabilität bei der Antigenausrichtung zwischen Inseln und Individuen [133, 147]. Es ist jedoch schwierig, quantitative Messungen der an der Autoimmunreaktion-beteiligten CD8+-T-Zellen in der Peripherie mit CD8+-T-Zell-vermittelten Ereignissen im Pankreas gleichzusetzen. Eine genauere Analyse der proliferierten CD8+-T-Zellen sollte mit einer größeren Menge an Zellen durchgeführt werden, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erlangen.

## **4.2. Polarisierbarkeit der Chemokinrezeptor-positiven T-Zellen**

Die Expression von Chemokinrezeptoren wurde bislang hauptsächlich in Tiermodellen und an CD4+-T-Zellen untersucht. Umso wichtiger ist es auch die Chemokinrezeptoren der CD8+-T-Zellen von menschlichen Lymphozyten zu untersuchen.

### **4.2.1. Chemokinrezeptor-positive CD4+-T-Zellen**

Mit Blick auf die proliferierten CD4+CCR5+-Th1-Zellen zeigt sich, dass im unstimulierten Ansatz die prozentuale Verteilung in allen drei Kohorten sehr ähnlich ist, während HD bei den proliferierten CD4+CXCR3+-Th1-Zellen im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit IAA doppelt so viele Zellen aufweisen als EM und LS und zwischen HD und LS ein signifikanter Unterschied besteht. Auch Lohmann et al [148] untersuchten die Expression von CCR5 und CXCR3 auf CD3+-T-Zellen und fanden heraus, dass bei EM weniger CD3+CCR5+/CXCR3+-T-Zellen auffindbar waren als bei HD. Zwischen HD und LS bestand jedoch kein Unterschied. Auch eine weitere Studie über CD4+CCR5+/CXCR3+-T-Zellen bestätigte dieser Ergebnisse [149]. Die Interpretation ihrer Untersuchungen war, dass die Zellen mit den Th1-spezifischen Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 zum Zeitpunkt der Diagnose in das entzündete Gewebe des Pankreas migriert sind und deshalb im peripheren Blut weniger stark nachzuweisen waren. Es ist jedoch zu erwähnen, dass Lohmann et al. die EM Patienten vor der ersten Insulintherapie untersuchten und nicht wie in unserer Untersuchung wenige Tage oder Wochen später. Es könnte also sein, dass die an der Th1-vermittelten Autoimmunreaktion beteiligten CD4+CCR5+-T-Zellen zum Zeitpunkt unserer Untersuchung wieder im peripheren Blut verteilt waren. Eine weitere Studie von Yamada et al. [150] zeigte, dass sich die CXCR3+-Expression bei erstmanifestierten T1DM Patienten je nach klinischem Erscheinungsbild stark unterschieden. Während die mit fulminanten T1DM eine niedrigere CXCR3-Expression aufwiesen, zeigten die mit normalem Krankheitsverlauf eine höhere Expression von CXCR3.

Nach Stimulation mit den Antigenen, besonders nach Stimulation mit GAD65, IAA und *Candida albicans*, zeigt sich ein erhöhter prozentualer Anteil der CD4+CCR5+-Th1-Zellen bei EM und teilweise bei LS im Vergleich zum unstimulierten Ansatz. Im Gegensatz dazu sinkt die Frequenz der proliferierten CD4+CCR5+-Th1-Zellen nach Stimulation mit den Antigenen bei HD im Vergleich zum unstimulierten Ansatz ab. Dies deutet daraufhin, dass durch die Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen lediglich bei EM eine deutliche Polarisierung zu den CCR5+-Th1-Zellen stattfindet und sich somit die Reaktion der an der Pathogenese des T1DM beteiligten CD4+CCR5+-T-Zellen auf die Autoantigene GAD65 und IAA zwischen EM und HD unterscheidet.

Bei weiterer Betrachtung des prozentualen Anteils der proliferierten CD4+CXCR3+-T-Zellen nach Stimulation mit GAD65, fällt auf, dass die Subpopulation bei EM im Vergleich zum unstimulierten Ansatz gleichbleibt, während sie bei HD und LS niedriger liegt. Auch hier zeigen sich also verschiedene Reaktionen auf das diabetesspezifische Antigen GAD65. Nach Stimulation mit IA2 und *Candida albicans* ist die Frequenz dieser Zellen in allen Kohorten kleiner als im unstimulierten Ansatz.

Der Chemokinrezeptor CCR6 kann auf Th17-Zellen und Treg exprimiert werden und ist somit gleichzeitig bei pro- und antiinflammatorischen Prozessen beteiligt [151-153]. In unserer Untersuchung sind die proliferierten CD4+CCR6+-T-Zellen im unstimulierten Ansatz bei EM am stärksten vertreten gefolgt von HD und LS. Nach Stimulation mit GAD65 ist diese Differenz aufgrund einer niedrigeren Anzahl der proliferierten CD4+CCR6+-T-Zellen in der HD Kohorte größer. Besonders auffallend ist, dass nach Stimulation mit *Candida albicans* der prozentuale Anteil bei HD deutlich größer ist als bei EM und LS. Zwischen HD und LS besteht in diesem Ansatz ein signifikanter Unterschied. Diese Ergebnisse unterstützen bisher durchgeführte Studien, die beschrieben, dass die CD4+CCR6+-T-Zellen bei voller Gesundheit eine Rolle bei der Immuntoleranz spielen, aber im Falle einer Autoimmunkrankheit, wie Rheumatoider Arthritis [154] oder Multiple Sklerose, die homöostatische Funktion gestört sein kann und es zu einem Anstieg von Th17-T-Zellen kommt [153]. Auch Lee et al. [155] zeigten an NOD-Mäusen, dass die Betrachtung von CCR6 bei der Entstehung

des T1DM wichtig ist indem sie durch Hemmung von CCR6 die Migration von Entzündungszellen zum Pankreas verhindert werden konnten.

Es gibt jedoch bislang keine uns bekannten Studien an humanen peripheren Blutzellen, die die Qualität und Quantität der CD4+CCR6+-T-Zellen in T1DM Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, noch die Polarisierbarkeit der CCR6+-T-Zellen nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen, untersuchen.

Außerdem zeigten Ferreira et al. [156], dass auch die von den CD4+CCR6+-T-Zellen, produzierten Zytokine wichtig für die Untersuchung dieser Subpopulation sind. Sie fanden heraus, dass die CD4+CD45RO-CCR6+-T-Zellen von T1DM mehr IL-17-produzierende T-Zellen aufwiesen als HD.

Obwohl mehrmals gezeigt wurde, dass CCR5+ proinflammatorische Funktionen aufweist, wurde in murinen Untersuchungen gezeigt, dass CCR5 nach Aktivierung der Treg-Zellen auf diesen hochreguliert wird und gleichzeitig einen stärkeren entzündungshemmenden Einfluss hat als CCR5-Tregs [157, 158]. Auch Untersuchungen an schwangeren Frauen zeigten, dass die CD4+CD25+CCR5+-T-Zellen eine starke hemmende Wirkung auf die Proliferation anderer Zellen hat [159]. Unsere Ergebnisse der proliferierten CD5+CD25+CCR5+-Effektor-Tregs zeigen, dass durch die spezifische Stimulation mit den Antigenen bei EM ein höherer prozentualer Anteil im Vergleich zum unstimulierten Ansatz und im Vergleich zu HD und LS vorliegt. Während die Frequenz der Subpopulation im unstimulierten Ansatz bei allen Kohorten ähnlich ist, besteht nach Stimulation mit GAD65 ein signifikanter Unterschied zwischen HD und EM. Auch nach Stimulation mit *Candida albicans* weisen EM deutlich mehr proliferierten CD4+CD25+CCR5+-T-Zellen auf als HD und LS. Eine Untersuchung an Psoriasis Patienten zeigte hingegen, dass die erkrankten Patienten weniger CCR5+-Tregs aufwiesen als gesunde Kontrollen. Gleichzeitig beschrieben diese, dass eine erhöhte Expression von CCR5 nicht zwingend zu einer erhöhten Treg-Funktion führt, sondern auch andere Faktoren beteiligt sind. Zusätzlich fanden sie heraus, dass CCR5+-Tregs bei Psoriasis

Patienten unzureichend supprimieren. Für unsere Ergebnisse bedeutet das, dass obwohl die CD4+CD25+CCR5+-Tregs im peripheren Blut der EM nach Stimulation mit den Antigenen erhöht ist, dies nichts über die Funktionalität aussagt. Es werden Suppressionsassays benötigt, um die Suppressionsfähigkeit dieser Subpopulation bei T1DM Patienten herauszufinden. Außerdem könnten die erhöhten prozentualen Anteile des Chemokinrezeptors CCR5+ auf Th1-Zellen und Tregs im Blut von EM darauf hinweisen, dass im Rahmen der Autoimmunkrankheit die Migration sowohl von proinflammatorischen Th1-Zellen als auch von antiinflammatorischen Effektor-Tregs in den Pankreas verstärkt werden soll.

#### **4.2.2. Chemokinrezeptor-positive CD8+-T-Zellen**

Die prozentualen Anteile der CD8+CCR5+- und CD8+CXCR3+-Th1-Zellen verhalten sich ähnlich wie die CD4+-Th1-Zellen. Während EM bei allen Ansätzen deutlich mehr CD4+CCR5+-T-Zellen aufweist als HD und LS, liegen die durchschnittlichen Werte bei den CD4+CXCR3+-T-Zellen bei HD deutlich höher als bei den T1DM Kohorten. Vergleicht man die Ergebnisse mit bereits durchgeführten Studien zeigt sich, dass diese herausfanden, dass zwischen T1DM Patienten und HD kein Unterschied in diesen beiden Subpopulationen besteht [148, 149]. Wichtig zu erwähnen ist jedoch, dass diese Untersuchungen nur an Kindern gemacht wurden, die maximale Inkubationszeit 72 h betrug, keine Analyse über proliferierte T-Zellen gemacht wurde und weder diese, noch andere Studien die Auswirkung der diabetesspezifischen Antigene auf diese Zellpopulationen untersucht haben. Ebenso wie bei den CD4+CCR5+-Th1-Zellen zeigt sich nach Stimulation mit GAD65 lediglich bei EM ein höherer Anteil dieser Subpopulation als im unstimulierten Ansatz, was wiederum darauf hindeuten könnte, dass GAD65 die Differenzierung zu zytotoxischen CCR5+-Th1-Zellen bei EM fördert.

Bei Betrachtung der proliferierten CD8+CCR6+-Th17/Treg-Zellen im unstimulierten Ansatz zeigt sich, dass EM einen größeren prozentualen Anteil aufweist als HD und LS. Nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen ist die Frequenz dieser T-Zellen bei HD deutlich größer als im

unstimulierten Ansatz, während sie bei EM kleiner ist und bei LS ungefähr gleichbleibt. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen HD und EM und zwischen HD und LS nach Stimulation mit GAD65. Auch nach Stimulation mit *Candida albicans* weisen die HD und EM signifikant mehr proliferierten CD8+CCR6+-T-Zellen auf als LS. Der Grund für die abgeschwächte Reaktion der CD8+CCR6+-T-Zellen bei den T1DM Patienten könnte unter anderem daran liegen, dass, wie Kondo et al. [160] beschrieben, die CD8+CCR6+-T-Zellen zwar Zytokine produzieren, aber keine Zielzellen töten. Außerdem haben sie die Fähigkeit, als Reaktion auf das hauptsächlich im Magen-Darmtrakt befindliche MIP-3a, zu migrieren. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Subpopulation bei der Entstehung des T1DM eher eine untergeordnete Rolle spielen könnte.

Auch wenn der prozentuale Anteil der CD25+CCR5+-T-Zellen innerhalb der CD8+-Subpopulation kleiner ist als der der CD4+-Kohorte, gibt es erkennbare Parallelen. Auch hier weisen in allen Ansätzen EM, gefolgt von LS, deutlich mehr proliferierten CD25+CCR5+-T-Zellen auf als HD. Im Vergleich zum unstimulierten Ansatz zeigen sich aber lediglich nach der Stimulation mit GAD65 bei EM höhere durchschnittliche Werte. Bei allen anderen Ansätzen liegen die Werte bei EM und LS unter denen des unstimulierten Ansatz, während bei HD die prozentuale Verteilung nach Stimulation mit GAD65 und IAA im Vergleich zum unstimulierten Ansatz größer ist. Die absoluten Werte liegen bei HD jedoch weiterhin deutlich unter den Werten von EM und LS. Nach Stimulation mit IA2 weisen LS signifikant mehr proliferierten CD8+CD25+CCR5+-T-Zellen auf als HD. Auch hier ist zu erwähnen, dass aufgrund der geringen Zellzahl die interindividuellen Unterschiede in allen Kohorten sehr groß sind und es weitere Untersuchungen benötigt, um aussagekräftige Ergebnisse und eventuelle Auswirkungen auf den T1DM liefern zu können.



## **4.3. Transkriptionsfaktoren**

### **4.3.1. Relative Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren Tbet, Rorc und Foxp3**

Bei Untersuchung der  $\Delta$ CT-Werte von Tbet zeigt sich, dass auch bei dem Th1-spezifischen Transkriptionsfaktor die Expression von Tbet neben IAA im unstimulierten Ansatz am höchsten ist. Während die Expression bei EM nach allen Stimulationen im Vergleich zum unstimulierten Ansatz kleiner ist, bleibt diese bei HD nach Stimulation mit IAA gleich und wird bei LS im Vergleich zum unstimulierten Ansatz größer. Besonders niedrige Expressionen zeigen sich in allen drei Kohorten nach Stimulation mit GAD65, wobei auch hier EM weniger Tbet exprimieren als HD und LS. Auch wenn die Korrelationsanalysen aufgrund der niedrigen Fallzahl mit Vorsicht zu betrachten sind, fällt auf, dass es zwischen Tbet und den Th1-spezifischen Chemokinrezeptoren CXCR3+ und CCR5+ nur signifikante negative Korrelationen gibt. Bei Tbet und CXCR3+ besteht eine signifikante negative Korrelation nach Stimulation mit IA2 und zwischen Tbet und CCR5+ zeigen sich signifikante negative Korrelationen nach Stimulation mit GAD65 und IAA bei LS. Erst vor wenigen Monaten veröffentlichten Wang et al. [161] ähnliche Ergebnisse ihrer Untersuchung der Tbet-Transkription bei LADA Patienten im Vergleich zu T2DM Patienten. Sie stellten fest, dass es weder Unterschiede zwischen LADA und T2DM gab, noch zwischen LADA Patienten mit hohen und niedrigen GAD-Ak. Ebenso zeigten Martin-Hervás et al. [162], dass es zwischen der Tbet Transkription von T1DM Patienten und HD keine Differenzen gab. Beide Studien wurden jedoch ohne Stimuli und Kultivierung durchgeführt. Eine weitere Studie von Sasaki [17] postulierte, dass bestimmte Polymorphismen des Tbet-Gens bei T1DM höhere Frequenzen aufweisen als bei Gesunden und somit nicht nur die relative Quantifizierung der Expression von Tbet interessant ist, sondern auch andere Faktoren bei der Entstehung des T1DM spielen könnten. Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es keinerlei Studien darüber wie sich diabetesspezifische Antigene auf die Transkription von Tbet auswirken und ob Korrelationen zwischen CCR und Transkriptionsfaktoren

bestehen. Da Tbet entscheidend für die Th1-Polarisation ist und diese bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie dem T1DM eine entscheidende Rolle spielt, wäre es wichtig weitere Untersuchungen zu dieser Thematik durchzuführen.

Ror- $\gamma$ t war der erste murine identifizierte spezifische Transkriptionsfaktor für die Th17-Subpopulation [163]. Bei Betrachtung der  $\Delta$ CT-Werte fällt auf, dass es unabhängig der Gruppenzugehörigkeit große interindividuelle Unterschiede innerhalb der Kohorten gibt, während die durchschnittlichen Werte der Gruppen sich kaum voneinander unterscheiden. Dennoch kann bei Betrachtung der individuellen Werte einzelner Probanden kein klares Muster nachgewiesen werden. Lediglich nach Stimulation mit GAD65 ist die Transkription von RORc bei LS stärker als bei HD und EM und nach Stimulation mit *Candida albicans* weisen EM eine höhere Expression auf. Außerdem zeigt sich, dass die RORc-Expression in allen Gruppen nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen im Vergleich zu der unstimulierten Probe kleiner ist. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren jedoch weniger stark. Interessanterweise zeigen sich signifikante Korrelationen zwischen RORc und den Chemokinrezeptoren CCR6+ und CD161+. Während die Expression von RORc und dem Th17/Treg-spezifischen CCR6+ nach Stimulation mit IAA bei HD und EM signifikant negativ miteinander korreliert, besteht eine positive Korrelation zwischen RORc und dem Th17-spezifischen CD161+ nach Stimulation mit IAA bei LS und nach Stimulation mit IA2 bei EM.

Diese Ergebnisse müssen jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahl vorsichtig betrachtet werden. Eine Studie an chinesischen T1DM Patienten fand ebenfalls heraus, dass sich die RORc Expression bei T1DM mit fulminantem Verlauf nach Stimulation mit GAD65 nicht von der von gesunden Kontrollen unterschied [164]. Martin-Hervás et al. [162] zeigten hingegen, dass T1DM Patienten weniger RORc transkribierten als HD. Der Unterschied in den Ergebnissen könnte darauf basieren, dass bei Martinez-Hervás et al. keine Stimulation stattgefunden hat und die Zellen nicht kultiviert wurden. Demgegenüber stehen die Untersuchungen von Arif et al. [165], die herausfanden, dass in den Langerhans-Inseln des Pankreas die relative RORc-Expression bei T1DM höher ist als bei gesunden

Kontrollen. Auf eine Analyse der PBMCs in der Peripherie wurde in diesem Fall verzichtet. Aufgrund der unterschiedlichen Aussagen und keinem vergleichbaren Studiendesign, wäre es wichtig weitere vergleichbare Daten zu erstellen, um herauszufinden, ob die diabetesspezifischen Autoantigene einen Einfluss auf die Transkription von RORc haben.

Auch FoxP3, ein Treg-spezifischer Transkriptionsfaktor, der die Th17-Zelldifferenzierung durch direkte Antagonisierung von ROR-c hemmt [45], weist keine Unterschiede zwischen den Kohorten auf. Im Einklang damit stehen die Untersuchungen von Kivling et al. [166], die bei T1DM Kindern im Vergleich zu gesunden Kontrollen keinen Unterschied in der Foxp3-Expression der spontan untersuchten PBMCs feststellten. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Martin-Hervás et al. [162], die zeigten, dass T1DM Patienten weniger Foxp3 transkribierten als HD. Allerdings wurden die Zellen nicht kultiviert, sondern die Expression an PBMCs direkt nach Isolierung gemessen. Auffallend ist, dass die Transkription von Foxp3 im unstimulierten Ansatz und nach Stimulation mit IAA deutlich höher ist als bei den anderen Stimuli. Das heißt, dass die Expression von FoxP3 durch GAD65, IA2 und *Candida albicans* unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit abnimmt und die Zellen sich zu einem nicht-regulatorischen Phänotyp entwickeln.

Diese Beobachtungen machten auch Hoffmann et. al, die herausfanden, dass nach Re-Stimulation die FoxP3-Expression bei Treg-Zellen hinunterreguliert wird [167]. Wichtig herauszufinden ist, ob diese Hinunterregulierung mit den in vitro Bedingungen zusammenhängt oder auch in vivo stattfindet. Ausgenommen hiervon ist die HD Kohorte nach Stimulation mit *Candida albicans* bei der die FoxP3 Expression im Vergleich zum unstimulierten Ansatz gleich bleibt. Da die Anzahl der Probanden in unserer Untersuchung zu klein war um Aussagen zu der Auswirkung der Antikörpertiter auf die FoxP3-Expression bei T1DM zu machen, wäre es zukünftig interessant die Ergebnisse von Link et al. [125] und Wang et al. [161] zu reproduzieren. Während Link et al. feststellten, dass bei Autoantikörper-positiven T1DM Patienten die Foxp3-Expression signifikant größer war als bei Autoantikörper-negativen Patienten, zeigen Wang et al. exakt das Gegenteil. Zu beachten ist, dass die Dauer der Erkrankung der untersuchten

T1DM Patienten und das Alter in den beiden Studien voneinander abwichen. Außerdem muss gesagt werden, dass bei unseren Untersuchungen die mRNA-Expression gemessen wurde und somit keine Aussagen über die Dysfunktion der Treg-Zellen gemacht werden können, da unter anderem keine funktionellen Assays durchgeführt wurden und auch der Methylierungsgrad von FoxP3 Enhancer- und Promoter-Regionen für die Funktion und Stabilität der Treg-Zellen von Bedeutung ist [168].

Bei Betrachtung der Korrelationen zwischen FoxP3 und dem Oberflächenmarker CD25+ zeigt sich eine signifikante negative Korrelation nach Stimulation mit GAD65 bei LS. Außerdem besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen der Expression von FoxP3 und CD25+CCR5+ nach Stimulation mit *Candida albicans* bei EM. Dies könnte darauf hinweisen, dass es nach Stimulation mit *Candida albicans* bei EM zu einer vermehrten Aktivierung der Th1-Zellen zu Ungunsten der FoxP3+-T-Zellen kommt. Da die Aussagekraft der Korrelationsanalysen limitiert ist und es bislang keine weiteren Korrelationsanalysen über spezifische Transkriptionsfaktoren und Chemokinrezeptoren gibt, wäre es zukünftig interessant, diese Analyse an mehr Probanden durchzuführen.

#### **4.3.2. Zusammenfassung und Limitationen von der qPCR-Messung**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die spezifischen Antigen-Stimuli besonders bei Tbet und FoxP3 einen hemmenden Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren haben unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit. Dennoch lässt sich besonders bei Tbet beobachten, dass EM die niedrigsten Expressionswerte aufweisen. Bei FoxP3 hingegen liegen die Werte der verschiedenen Kohorten sehr nah beieinander und auch die interindividuellen Unterschiede sind verhältnismäßig klein. Anders verhält es sich mit der Expression von RORc, die zwar große interindividuelle Unterschiede aufweist, jedoch keine großen Veränderungen nach Stimulation mit den verschiedenen Antigenen aufweist. Da die Probandenanzahl in unserer Untersuchung sehr klein ist, es wenig Literatur zu dieser Thematik gibt und es jedoch relevant für die

Pathogenese des T1DM ist, wäre es interessant weitere Erkenntnisse über die Regulation der T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren zu bekommen.

Abschließend ist zu erwähnen, dass auch Limitationen an den Ergebnissen der relativen Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren an den PBMCs gibt. Da sich die Transkription meist lediglich zu Beginn rasch ändert, könnte die lange Kulturzeit ein Grund dafür sein, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen und den drei Kohorten gibt. Außerdem sind zwar die Transkriptionsfaktoren Hauptregulatoren der T-Zelldifferenzierung, aber die Genexpression wird zusätzlich von anderen Faktoren reguliert. Die Expression von Genen kann durch die Methylierung von DNA, der Modifizierung von Histonen und post-transkriptionell von microRNAs verändert und somit die Differenzierung zu einer bestimmten Th-Subpopulation nachträglich beeinflusst werden [169-171]. Hinzu kommt, dass es Zellen gibt, die zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren koexprimieren und somit nicht einer bestimmten Zellpopulation zugeteilt werden können, sondern je nach Zytokinmilieu den einen oder den anderen Transkriptionsfaktor exprimieren [172, 173]. Da die Transkriptionsfaktoren ausschließlich in den Gesamtlymphozyten gemessen wurden, ist es für zukünftige Untersuchungen interessant die Expression der Transkriptionsfaktoren in spezifischen Th-Subpopulationen zu untersuchen, um genauere Erkenntnisse zu erlangen (beispielsweise FoxP3 in CD4+CD25+-T-Zellen). Außerdem sollten die Korrelationsanalysen der Transkriptionsfaktoren und Chemokinrezeptoren an mehr Probanden untersucht werden, um aussagekräftige Ergebnisse liefern zu können.

## **4.4. Zytokine**

### **4.4.1. Th1-spezifische Zytokine**

Mit Blick auf IFN- $\gamma$  zeigt sich besonders im unstimulierten Ansatz, dass die PBMCs von EM deutlich weniger IFN- $\gamma$  produzieren als HD und LS. Zur gleichen Erkenntnis kamen Halminen et al. [174], die die IFN- $\gamma$ -Produktion von erstmanifestierten T1DM Kindern mit gepaarten gesunden Kindern verglichen und herausfanden, dass die T1DM weniger IFN- $\gamma$  produzierten. Andererseits

fanden Chatzgeorgiou et al. [175] heraus, dass bei erstmanifestierten T1DM Patienten sowohl proinflammatorische als auch anti-inflammatorische Zytokine im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht waren, während Han et al. [176] dieselben Ergebnisse bei Langzeiterkrankten und Gesunden beschrieben.

Auch nach Stimulation mit GAD65 blieb die IFN- $\gamma$ -Produktion der EM unter der von HD. Obwohl dieses Ergebnis überrascht, hat die Arbeitsgruppe um Strom et al. [177] die gleichen Ergebnisse hervorgebracht. Abweichungen zu diesen Ergebnissen ergaben frühere Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen [118, 178], welche eine Zunahme der IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit GAD65 beobachteten. Diese Ergebnisse postulieren, dass bei der Erstmanifestation des T1DM eine antigenspezifische Th1-moderierte Autoimmunreaktion eine große Rolle spielen könnte.

Die Heterogenität der Ergebnisse könnte auf Unterschiede im Protokoll, der Antikörpertiter, des Alters oder der Diabetesdauer zurückzuführen sein. Ein weiterer Grund für die verringerte IFN- $\gamma$ -Produktion könnte die Untersuchung an PBMCs in der Peripherie sein. Die IFN- $\gamma$ -Produktion, die zur Zerstörung der Beta-Zellen führt, findet eventuell lediglich in unmittelbarer Nähe des Pankreas statt [179]. Außerdem konnte durch eine Untersuchung von Faresjö et al. [180] an Hochrisikopersonen herausgefunden werden, dass durch in vitro Stimulation mit Autoantigenen eine verminderte Th1-Reaktion stattfindet. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine gestörte beziehungsweise verminderte Th1-Reaktion an der Entstehung von T1DM beteiligt sein könnte.

Bei Betrachtung der Werte nach Stimulation mit *Candida albicans*, zeigt sich, dass mit anhaltender Erkrankungsdauer die Produktion von IFN- $\gamma$  ansteigt. Die LS produzieren dreimal so viel IFN- $\gamma$  wie die EM und diese wiederum dreimal so viel wie die HD. Interessanterweise spielt IFN- $\gamma$  bei der Bekämpfung von *Candida albicans*-Infektionen eine große Rolle [181]. Die starke Reaktion der LS auf diesen Stimuli deutet darauf hin, dass eine Infektion besonders bei Langzeiterkrankten eine starke proinflammatorische Reaktion des Immunsystems auslöst.

Die durchschnittliche Konzentration von TNF- $\alpha$  variiert in den verschiedenen Ansätzen und den drei Kohorten stark. Im unstimulierten Ansatz liegen die Konzentrationen von LS und EM über denen von HD, während sich die Verhältnisse nach Stimulation teilweise verändern. Auch in der Metaanalyse von Qiao et al. [182] fand man heraus, dass es große Unterschiede in den bisherigen Untersuchungen gibt. Erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen wurden vor allem bei T1DM Patienten mit einer inadäquaten Blutglukoseeinstellung und einem erhöhten HbA1c [183, 184] beobachtet. Eine andere Arbeitsgruppe postulierte, dass es keine Unterschiede in der TNF- $\alpha$ -Konzentration zwischen T1DM Patienten und ihren gesunden Geschwistern gibt [185]. Wichtig zu erwähnen ist, dass sich die Untersuchungen in ihren Designs unterscheiden und die Vergleichbarkeit deshalb limitiert ist. Es werden weitere Untersuchungen benötigt um herauszufinden, ob die diabetesspezifischen Antigene eine Veränderung von TNF- $\alpha$  verursachen und ob TNF- $\alpha$  bei der Entstehung des T1DM eine Rolle spielt.

Die Konzentrationen vom ebenso von den Th1-Zellen produzierten IL-1 $\beta$  sind bei allen Ansätzen bei EM kleiner als bei HD. Die Werte des unstimulierten Ansatzes lassen sich mit den Ergebnissen von Aribi et al. vergleichen [186], welche im Vergleich zu HD bei EM erhöhte IL-1 $\beta$ -Werte nachweisen konnten. Die Unterschiede könnten unter anderem durch das durchschnittlich höhere Alter der Studienpopulation und der längeren Kultivierung in der vorliegenden Untersuchung verursacht worden sein.

Die Analyse von IL-12 ergibt, dass die T1DM Kohorten, unabhängig von der Krankheitsdauer, im unstimulierten Ansatz mehr IL-12 produzieren als HD. Die Ergebnisse von Ryba-Stanisławowska et al. [187] fanden ebenfalls heraus, dass die IL-12-Konzentration bei T1DM Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht ist. Dass eine Verbindung zwischen IL-12 und T1DM besteht, bestätigte auch eine Studie, die feststellte, dass mit Glukose-stimulierte PBMCs mehr IL-12 produzierten als unstimulierte PBMCs [188].

Bei allen anderen Stimulationen, außer nach Stimulation mit GAD65, zeigten die EM höhere IL-12-Konzentrationen als HD und LS. Dies darauf hinweisen könnte,

dass IL-12 bei der Pathogenese von T1DM als proinflammatorisches Zytokin, das die Th1-Differenzierung vorantreibt, eine Rolle spielt. Auch hier sollten zukünftig weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

#### **4.4.2. Th17-spezifische Zytokine**

Eine Beteiligung von IL-17 an der Pathogenese des T1DM ist in murinen Versuchen vielfach beschrieben. Emamaullee et al. fanden beispielsweise erstmals heraus, dass die Inhibierung von Th17-Zellen mit anti-IL-17 die Pathogenese von T1DM in NOD Mäusen beeinflussen kann [189]. Beim Menschen ist die Rolle von Th17-Zellen und dem von diesen Zellen produzierten Zytokin IL-17 weiterhin unklar. Honkanen et al. [130] beobachteten eine erhöhte IL-17-Produktion bei T1DM Kindern im Vergleich zu gesunden Kontrollen und konnten gleichzeitig einen Zusammenhang zwischen IL-17 und dem Beta-Zellschaden herstellen. Unterstützend wirken die Ergebnisse von Marwaha et al. [129] und Arif et al. [165], die IL-17 ebenso eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese von T1DM zuschreiben. Aktuelle Studien befassen sich mit der Rolle von Zellen, die IFN- $\gamma$  und IL-17 koproduzieren [190]. Reinert-Hartwall et al. fanden heraus, dass T1DM Kinder mehr IL-17+-IFN- $\gamma$ -produzierende-T-Zellen aufweisen als gesunde Kontrollen [191].

Die Ergebnisse stimmen im unstimulierten Ansatz mit unseren überein, da die EM durchschnittlich nicht nur deutlich mehr IL-17 produzierten als die HD, sondern ebenso mehr als die LS. Dennoch lässt sich beobachten, dass nicht in allen Ansätzen die Konzentrationen von IL-17 bei EM größer sind als bei HD und LS. Nach Stimulation mit IA2 produzieren EM zwar signifikant mehr IL-17 als LS, nach Stimulation mit GAD65 und *Candida albicans* hingegen liegen die IL-17-Konzentrationen bei EM unter denen von HD und LS. Da nachgewiesen werden konnte, dass IL-17 für die Wirtsabwehr gegen *Candida albicans* verantwortlich ist, könnte die erhöhte IL-17 Produktion der LS nach Stimulation mit *Candida albicans* auf eine verstärkte proinflammatorische Reaktion nach dieser Infektion hinweisen [192]. Diese Ergebnisse unterscheiden sich teilweise von Arif et. al [165], die bei erstmanifestierten T1DM Patienten eine erhöhte IL-17 Produktion nach Stimulation mit GAD65 und IA2 feststellten. Ursächlich für die



Unterschiede könnte die Verwendung von Peptiden, die natürlich von HLA-DR4 verarbeitet und präsentiert wurden und eine unterschiedliche Zellkulturdauer sein, denn diese wirkt sich stark auf die IL-17-Produktion aus [193].

Dass IL-6 für die Differenzierung zu Th17-Zellen verantwortlich ist, wurde bereits von Acosta-Rodriguez beschrieben [194]. Interessanterweise gehen die Meinungen zu den IL-6 Konzentrationen auseinander. Während Han et al. [176] und Martinez-Hervás et al. [162] unsere Ergebnisse bestätigen, dass HD im unstimulierten Ansatz deutlich mehr IL-6 aufweist als LS, zeigten Bradshaw et al. [195], dass bei neu aufgetretenem T1DM im Vergleich zu altersgerechten Kontrollen die IL-6-Konzentration erhöht war. Da IL-6 proinflammatorisch ist und die Th-17-Differenzierung vorantreibt, postulierten diese, dass diese Beobachtung mit der Zunahme von IL-17-produzierenden T-Zellen bei der Entstehung des T1DM verbunden sein könnte [196]. Da bei uns HD und LS auch nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen mehr IL-6 produzieren als EM, könnte sich die Wirkung von IL-6 auf die Differenzierung von naiven T-Zellen zu IL-17-produzierenden Th17-Zellen sich bei erstmanifestierten T1DM Patienten von gesunden Kontrollen und langzeiterkrankten T1DM Patienten unterscheiden. Auch wenn es einzelne Studien an NOD-Mäusen gibt, die eine Korrelation zwischen der Überexpression von IL-6 auf den Beta-Zellen und der Entstehung einer Insulitis feststellen konnten [197], bleibt es unklar welchen Beitrag IL-6 an der Pathogenese des T1DM beim Menschen leistet [198]. Außerdem kann die vermutete lokale pro-inflammatorische Rolle von IL-6 während der Erstmanifestation von T1DM durch die Analyse der Überstandsproben aus der Stimulation der peripheren Lymphozyten nicht abgeschätzt werden.

Dass andere Zytokine wie IL-23 und IL-1 $\beta$  die Entwicklung zu Th17-Zellen fördern wurde bereits mehrfach untersucht und könnte auch Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen [194, 199]. Außerdem zeigen verschiedene Studien, dass Insulin eine Suppression des Immunsystems bewirken kann und somit die Zytokinproduktion beeinflussen könnte [200, 201].

#### 4.4.3. Treg-spezifische Zytokine

Eine Metaanalyse von Qiao et al. [202] zeigte, dass es in Studien, die sich mit IL-10 befassten, keine Assoziation zwischen der IL-10-Konzentration und T1DM gibt. Während Haseda et al. [203] zeigten, dass sich das Niveau von IL-10 nach einem Suppressionsassay mit Responderzellen und aktivierten Tregs bei T1DM nicht von HD unterschied, beschrieben Jia et al. [204], dass die IL-10-Spiegel bei T1DM Patienten signifikant niedriger waren als bei gesunden Kontrollen. Unsere Untersuchungen bestätigen diese Ansicht, denn im unstimulierten Ansatz haben HD eine mehr als dreifach so hohe Konzentration von IL-10 als EM und LS. Han et al. [176] beschrieben hingegen, dass die IL-10-Produktion bei EM größer ist als bei HD und LS.

Nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* sinkt die Konzentration bei HD deutlich ab, während sie bei EM und LS im ähnlichen Bereich zum unstimulierten Ansatz liegen und sich die Werte der drei Kohorten annähern. Rapoport et al. [205] beobachteten ebenfalls, dass sich nach unspezifischer Stimulation der PBMCs die Konzentrationen von IL-10 bei erstgradig Verwandten von T1DM Patienten nicht von gesunden Kontrollen unterschieden. Eine Untersuchung der Arbeitsgruppe um Petrich de Marquesini [178] ergab jedoch, dass die IL-10-Produktion nach Stimulation mit IA2 bei HD größer war als bei EM. In dieser Studie lag die Stimulationszeit bei 18 h und somit deutlich kürzer als in den anderen beiden Studien. Es benötigt weitere Untersuchungen, um die Produktion von IL-10 nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen zu eruieren und die Rolle von IL-10 in der Pathogenese des T1DM abzuschätzen.

IL-2 hat sowohl immunstimulierende als auch immunregulatorische Funktionen und spielt somit eine entscheidende Rolle beim Schutz vor Autoimmunität [206]. Entscheidend für das Verständnis von IL-2 und Tregs ist, dass die Tregs in Abwesenheit von IL-2 zwar absterben, aber gleichzeitig die einzige Th-Subpopulation sind, die bei niedrigen IL-2-Konzentrationen aktiviert werden können. Deshalb kann das Fehlen von IL-2 zu Autoimmunerkrankungen führen, zu hohe Konzentrationen autoreaktive T-Zellen aktivieren und niedrige

Konzentrationen als Therapieziel zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen genutzt werden [207-210].

Bei Betrachtung der IL-2-Konzentrationen im unstimulierten Ansatz, zeigt sich, dass die LS tendenziell mehr IL-2 produzieren als HD und EM. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die PBMCs der EM nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen GAD65 und IAA mehr IL-2 produzieren als im unstimulierten Ansatz und als die HD und LS. Es gilt herauszufinden, welche Th-Subpopulation für diese vermehrte Produktion verantwortlich ist und wie sich die Produktion von IL-2 nach Stimulation mit GAD65 und IAA auf die Anzahl und Funktion der Tregs und autoreaktiven T-Zellen auswirkt, da zu hohe Konzentrationen die Autoreaktivität erhöhen können [207, 211]. Auffallend sind außerdem die niedrigen IL-2-Konzentrationen von LS nach Stimulation mit IA2 und *Candida albicans* im Vergleich zu denen von EM. Da bereits bekannt ist, dass LS ein erhöhtes Risiko haben an *Candida albicans* zu erkranken, wäre es wichtig weitere Untersuchungen zu machen, ob die niedrige IL-2-Produktion mit der Pathogenese in Verbindung stehen könnte.

Außerdem gibt es weitere Studien, die zeigen, dass besonders der IL-2R eine wichtige Rolle bei der Entstehung des T1DM spielen könnte, da T1DM Patienten eine andere Genvariante des IL-2RA aufweisen, die zu einer verminderten IL-2 Reaktionsfähigkeit und somit zu einer Verringerung der Suppressionsfähigkeit der Tregs führt [212, 213]. Es gilt also zukünftig nicht nur die IL-2-Konzentration, sondern auch die Genvariante des IL-2RA zu untersuchen.

#### **4.4.4. Th2-spezifische Zytokine**

Betrachtet man die IL-4-Produktion im unstimulierten Ansatz, fällt auf, dass die durchschnittliche Konzentration von HD kleiner ist als von EM und LS. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von Han et. al [176] zeigt sich, dass die Unterschiede zwischen EM und HD übereinstimmen, die LS jedoch deutlich weniger IL-4 als die anderen beiden Kohorten produzierten. Im Gegensatz dazu beschrieben Halminen et al. [174] eine signifikant niedrigere IL-4-Produktion bei EM im Vergleich zu HD und unterstützen die These, dass IL-4 durch

Supprimieren von IFN- $\gamma$  eine protektive Wirkung bei der Entstehung von T1DM haben soll [214].

Nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* steigt der Unterschied der IL-4-Produktion zwischen EM und den Kohorten HD und LS weiter an.

Ebenso verhalten sich die Konzentrationen der anderen Th2-spezifischen Zytokinen IL-5 und IL-13. Auch hier produzieren über allen Ansätzen EM durchschnittlich mehr dieser Zytokine als HD und LS. Signifikante Unterschiede liegen jedoch nicht vor.

Die Ergebnisse unserer Arbeit könnten darauf hinweisen, dass die regulatorischen Zytokine des Immunsystems, wie IL-4, IL-5 und IL-13, im Falle einer Autoimmunreaktion hochreguliert werden, um den proinflammatorischen Zytokinen entgegenwirken [215].

#### **4.4.5. Zusammenfassung und Limitationen Zytokine**

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass sich die Zytokinproduktion in den verschiedenen Ansätzen oftmals verändert und teilweise ein Unterschied zwischen HD, EM und LS besteht. Da die maximale Zytokinproduktion nach Stimulation bei den meisten Zytokinen innerhalb der ersten 24-72 h auftritt [22, 207, 216], in dieser Studie jedoch zusätzlich zur Zytokinproduktion noch andere Untersuchungen gemacht wurden und deshalb die Zellkulturdauer bei 7 Tagen liegt, müssen die Daten kritisch betrachtet werden. Außerdem können wir keine Aussagen darüber machen, welche Th-Subpopulationen die Zytokine produzieren und welche Auswirkungen die Zytokinproduktionen auf verschiedene Th-Subpopulationen haben. Da auch genetische Faktoren, das Alter, das Geschlecht, das Körpergewicht und vor allem das Stressniveau die Zytokinproduktion beeinflussen [217], sind weitere detaillierte Untersuchungen zu machen, um die Zytokinproduktion bei T1DM Patienten nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen im Vergleich zu Gesunden besser beurteilen zu können.

## **4.5. Technische Limitationen**

Die erarbeiteten Ergebnisse dieser Studie unterliegen aufgrund ihres experimentellen Charakters den nachfolgenden Limitationen.

### **4.5.1. Heterogenität der Gruppen**

Obwohl die Kohorten sich in ihren deskriptiven Eigenschaften ähneln, ist zu erwähnen, dass besonders das Alter der T1DM Patienten in den Kohorten EM und LS relativ weit auseinander liegen. Hinzu kommt, dass nicht für alle Patienten Informationen zu ihren Antikörpertitern bei Erstmanifestation und anderen potentiell wichtigen Parametern (Gewicht, HbA1c, C-Peptid, Menge des applizierenden Insulins etc.) vorlagen.

### **4.5.2. Unterteilung der Subpopulationen**

Die Unterteilung und Definition der Subpopulationen erfolgte mithilfe von stetigen Oberflächenmarkern. Diese starre Unterteilung steht im Widerspruch zu der in aktuellen Studien untersuchten und im Kapitel 1.2.4.4 angesprochenen Plastizität der T-Zellen. Sowohl der Phänotyp als auch das Zytokinprofil einer spezifischen T-Zelle sind nicht irreversibel, sondern können sich je nach ausgesetztem Zytokinmilieu und Aktivität des Transkriptionsfaktors einer T-Zelle verändern. Ein Beispiel hierfür ist die Tatsache, dass FoxP3 als Treg-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben wird, dieser jedoch auch von CD4+-T-Helferzellen und CD8+-zytotoxische-T-Zellen exprimiert werden kann [218].

### **4.5.3. Untersuchung von peripheren T-Lymphozyten**

Die Beantwortung der Frage, ob und in welcher Menge diabetesspezifische autoreaktive T-Zellen bei T1DM Patienten nachzuweisen sind, wird durch die Tatsache, dass wir T-Zellen aus dem peripheren Blut untersuchen, erschwert. Man kann davon ausgehen, dass durch die beschränkte Untersuchung der T-Zellen in der Peripherie deutlich weniger autoreaktive-T-Zellen detektierbar sind als bei Untersuchungen, die in der Nähe des Pankreas oder an Pankreasgewebe durchgeführt werden. Obwohl unklar ist, ob die peripher

vorhandenen T-Zellen das Reaktionsverhalten der an der Entzündung des Pankreas beteiligten T-Zellen widerspiegeln, gilt die Untersuchung der T-Zellen im peripheren Blut als Standard. Es könnte durchaus sein, dass die von uns in vitro gemessenen geringen Mengen an autoreaktiven T-Zellen im Pankreas eine Autoimmunreaktion auslösen können.

#### **4.5.4. In-vitro Zellkultur**

Von großer Bedeutung ist der Unterschied der in vivo und in vitro Verhältnisse. Während in vivo viele verschiedene Zellen mit unterschiedlichen Funktionen die Immunreaktion beeinflussen und die Bestandteile des Immunsystems dauerhaft zu- und abfließen können, bleiben bei einer Zellkultur alle humoralen und zellulären Bestandteile bestehen. Hinzukommt, dass durch eine einzelne starke spezifische Stimulation der PBMCs, ohne Hinzugabe von anderen auf die Immunreaktion einflussnehmende Faktoren, die in vivo Verhältnisse nicht 1:1 nachgeahmt werden können. Aus organisatorischen Gründen konnte nicht für jede der Untersuchungen (FACS, qPCR, Zytokinmessung) der geeignetste Zeitpunkt berücksichtigt werden. Da nach 7 Tagen Zellkultur die beste Proliferation der Zellen nachzuweisen war, wurden auch die Konzentration der Zytokine nach 7 Tagen untersucht, obwohl deren maximale Konzentration normalerweise bereits früher erreicht wird. Das gleiche gilt für die Ergebnisse der PCR, da Transkriptionsfaktoren das höchste Ausmaß der Regulation typischerweise innerhalb weniger Stunden nach Stimulation zeigen. Außerdem kann aufgrund der Tatsache, dass die Stimulation an PBMCs durchgeführt wurde und keine vorige Zellseparation stattgefunden hat, die Zytokinproduktion und die Expression der Transkriptionsfaktoren keiner T-Zell-Subpopulation zugeordnet werden.

Obwohl es gewisse Nachteile der in vivo Zellkultur gibt, können hier durch eine Standardisierung des Versuchsaufbaus andere Störfaktoren verringert werden und Veränderungen des artifiziellen Systems besser auf bestimmte Mechanismen zurückgeführt werden.

## **5. Ausblick**

Durch die vielseitigen Ergebnisse dieser Untersuchung durch unterschiedliche Methoden, eröffnen sich viele weitere Ansatzpunkte für zukünftige Studien. Es wäre wünschenswert die Untersuchung mit mehr Patienten und gesunden Kontrollen durchzuführen, um die Ergebnisse zu überprüfen und noch aussagekräftigere Ergebnisse ableiten zu können. Außerdem sollten von allen Patienten Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Erstmanifestation und der Laboruntersuchung bekannt sein, um herauszufinden, ob die Höhe der Antikörpertiter mit der Reaktion der T-Zellen auf das bestimmte Autoantigen korreliert.

Besonders bei der Messung der proliferierenden T-Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie wäre es wichtig eine größere Anzahl an Zellen zu untersuchen, um bei den Subpopulationen noch wirksamere Aussagen machen zu können. Außerdem wäre es interessant die proliferierenden Subpopulationen zu isolieren und deren Zytokinproduktion oder Expression der Transkriptionsfaktoren zu messen, da sich die vorliegenden Ergebnisse lediglich auf die Gesamtproduktion der PBMCs beziehen. So könnte man beispielsweise herausfinden, welche Subpopulationen pro- und welche antiinflammatorische Zytokine nach Stimulation mit einem diabetesspezifischen Antigen produzieren und somit an der Pathogenese des T1DM beteiligt sind. Hinzu kommt, dass es nicht nur interessant wäre die Subpopulationen zu identifizieren, sondern beispielsweise Suppressionsassays zu machen, um herauszufinden, ob die Autoantigen-spezifischen Tregs der T1DM Patienten eine veränderte regulatorische Funktion aufweisen als die von gesunden Probanden.

Da der Zeitpunkt der maximalen Zytokinproduktion nicht mit dem geeignetsten Zeitpunkt der Proliferationsmessung übereinstimmt, ist es wichtig diese Untersuchungen zukünftig zu separieren und Kulturen mit unterschiedlicher Dauer anzulegen.

Außerdem ist die Probenanzahl der durchgeführten qPCR sehr klein und es wäre wichtig die spezifischen Transkriptionsfaktoren der an der Pathogenese-beteiligten Th1, Th17 und Treg-Zellen bei mehr Probanden zu untersuchen.

Aufgrund der steigenden Anzahl der T1DM Patienten und der bestehenden Ungewissheit welche Rolle die Autoantigene an der T-Zell-vermittelten-Pathogenese des T1DM nehmen, ist die Fortführung der humanen T-Zell-Forschung an T1DM Patienten von enormer Wichtigkeit. Durch weitere Erkenntnisse in diesem Gebiet könnten eventuell T-Zellen, Zytokine oder Transkriptionsfaktoren entdeckt werden, die durch eine zielgerichtete Therapie gehemmt und somit die Zerstörung der Beta-Zellen und die Entstehung des T1DM aufgehalten werden könnte.



## **6. Zusammenfassung**

Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische Autoimmunkrankheit, bei der die Beta-Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas durch autoreaktive T-Lymphozyten zerstört werden und somit die Insulinproduktion zum Erliegen kommt.

Die vorliegende prospektive Querschnittsstudie untersucht die die Reaktion und Polarisierbarkeit der peripheren T-Lymphozyten, die Zytokinproduktion der PBMCs und die Expression der spezifischen Transkriptionsfaktoren Tbet (Th1), FoxP3 (Th17) und RORc (Treg) nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen und *Candida albicans* bei sieben gesunden Kontrollen, neun erstmanifestierten T1DM Patienten und elf langzeiterkrankten T1DM Patienten.

Bei der Untersuchung der spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigte sich, dass EM sowohl im unstimulierten Ansatz, aber auch nach Stimulation mit den Antigenen eine größere Proliferationsaktivität aufwies als HD und LS. Interessanterweise war ein vergleichbarer Unterschied bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen lediglich nach Stimulation mit GAD65 zu sehen. Bei Betrachtung der CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen erkennt man, dass es in allen Kohorten große interindividuelle Unterschiede gibt und man keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten beobachten kann. Trotzdem lässt sich sagen, dass sich die Subpopulationen nach den spezifischen Stimulationen in den drei Kohorten teilweise unterschiedlich verschieben und dies Anzeichen dafür ist, dass die T-Zellen der T1DM Patienten auf diese Antigene anders verhalten als HD. Bei den CD8<sup>+</sup>-TEMRA gibt es mehrere signifikante Unterschiede und es fällt auf, dass EM deutlich weniger TEMRA aufweisen als die anderen beiden Kohorten. Sowohl bei den CD25<sup>+</sup>-Tregs als auch bei den CD161<sup>+</sup>-Th17-Zellen zeigen sich keine relevanten Signifikanzen.

Die Chemokinrezeptor-tragenden weisen sowohl bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als auch bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Unterschiede und auch Parallelen zwischen den Kohorten auf. Während sich die CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>-Th1-Zellen bei EM durch die Antigene polarisieren lassen, findet bei HD keine Polarisierung statt. Dafür tragen

die HD über allen Ansätzen mehr CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>-Th1-Zellen als EM. Bei den Chemokinrezeptoren CCR6<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> zeigen sich keine bemerkenswerten Unterschiede oder Polarisierungen durch die Antigene.

Im Einklang mit den Ergebnissen der Phänotypisierung der Th1, Th17 und Treg-Zellen stehen die der spezifischen Transkriptionsfaktoren. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kohorten vorhanden. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass die relative Transkription nach Stimulation mit den Antigenen in allen drei Kohorten fast ausnahmslos abnahm. Abschließend ist zu erwähnen, dass die Probandenzahl bei dieser Untersuchung sehr klein war und große interindividuelle Unterschiede vorlagen.

Bei Betrachtung des Th1-spezifischen Zytokins IFN- $\gamma$  fiel auf, dass HD und LS im unstimulierten Ansatz deutlich mehr produzierte als EM, während die Konzentrationen durch Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen bei HD und LS stark abfiel und bei EM annähernd gleichgeblieben ist. Auffallend war außerdem, dass die durchschnittliche Produktion des Th17-spezifischen Zytokins IL-17 von EM in vielen Ansätzen deutlich größer war als von HD. Das hauptsächlich von den Treg-Zellen produzierte IL-10 war bei den T1DM Patienten deutlich kleiner als bei HD. Ebenso wie IFN- $\gamma$  fiel die Konzentration durch die Stimulationen bei HD jedoch stark ab, während sie bei EM und LS gleichblieb oder anstieg. Insgesamt lässt sich sagen, dass es große interindividuelle Unterschiede innerhalb der Kohorten hinsichtlich der Produktion der Zytokine in den verschiedenen Ansätzen gab. Somit ist es von enormem Interesse, die Zytokinproduktion nach Stimulation mit den diabetesspezifischen Antigenen in den verschiedenen Kohorten an einer größeren Anzahl an Probanden zu untersuchen.

Zusammenfassend ergeben sich einzelne Hinweise, dass sich die Reaktion der T-Zellen auf diabetesspezifische Antigene bei erstmanifestierten T1DM von HD unterscheiden. Inwieweit einzelne Autoantigen-spezifische Subpopulationen, Transkriptionsfaktoren oder proinflammatorische bzw. antiinflammatorische Zytokine eine Rolle in der Pathogenese des T1DM spielen und diese ein

Angriffsziel für Therapeutika sein könnten, gilt es weiterhin in humanen Studien herauszufinden.

## **7. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Klassifizierung des Diabetes mellitus. ....	1
Tabelle 2: Eigenschaften der Subpopulationen der T-Zellen.....	15
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 4: Softwares für die Auswertung.....	25
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien für die Versuche.....	26
Tabelle 6: Puffer und Medien .....	27
Tabelle 7: Gebrauchsfertige Lösungen .....	28
Tabelle 8: Antigene für Zellstimulation .....	28
Tabelle 9: Antikörper für die extrazelluläre Färbung der Oberflächenmarker ...	29
Tabelle 10: Materialien für Reverse Transkription.....	30
Tabelle 11: Primer mit DNA-Abschnitt.....	30
Tabelle 12: Gebrauchsfertige Kits für RNA- und DNA-Isolierung.....	31
Tabelle 13: Kit für Zytokinmessung aus dem Überstand .....	31
Tabelle 14: Ein- und Ausschlusskriterien der gesunden Kontroll-Probanden...	32
Tabelle 15: Ein- und Ausschlusskriterien T1DM Patienten.....	33
Tabelle 16: Konzentrationen der Antigene. ....	37
Tabelle 17: Extrazelluläre Färbung der Oberflächenantigene .....	41
Tabelle 18: Übersicht der Konzentrationen der Standardlösungen der einzelnen Zytokine.....	43
Tabelle 19: Substanzen für die Reverse Transkription.....	45
Tabelle 20: Substanzen für die qPCR .....	47
Tabelle 21: Deskriptive Charakterisierung der Kohorten HD, EM und LS. ....	49
Tabelle 22: Eigenschaften der T1DM Kohorten EM und LS.....	50
Tabelle 23: Darstellung der Eigenschaften der einzelnen T1DM Patienten EM und LS.....	51
Tabelle 24: Mittelwerte der verschiedenen Zellen im Differentialblutbild. Die Leukozytenzahlen sind absolute Werte, während die anderen Zellen in % von den Leukozyten angegeben sind.....	52
Tabelle 25: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der proliferierten CD4+-T-Zellen in den Lymphozyten in Kultur bei HD, EM und LS. ....	57

Tabelle 26: Durchschnittliche Ratio der proliferierten CD4+-T-Zellen nach Stimulation mit PHA und einem anderen Stimulus in HD, EM und LS. ....	59
Tabelle 27: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Subpopulationen in den proliferierten CD4+-T-Zellen bei HD, EM und LS.. ....	64
Tabelle 28: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der proliferierten CD8+-T-Zellen in den Lymphozyten in Kultur bei HD, EM und LS. ....	65
Tabelle 29: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Subpopulationen in den proliferierten CD8+-T-Zellen bei HD, EM und LS. ....	69
Tabelle 30: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der migrierenden T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen bei HD, EM und LS. ....	72
Tabelle 31: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der migrierenden T-Zellen in den proliferierten CD8+-T-Zellen bei HD, EM und LS. ....	74
Tabelle 32: Durchschnittliche $\Delta$ CT-Werte von Tbet (Th1) in den PBMCs in HD, EM und LS. ....	77
Tabelle 33: Durchschnittliche $\Delta$ CT-Werte von RORc (Th17) in den PBMCs in HD, EM und LS. ....	78
Tabelle 34: Durchschnittliche $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 (Treg) in den PBMCs in HD, EM und LS. ....	79
Tabelle 35: Korrelation zwischen den $\Delta$ CT-Werten von Tbet und den % der proliferierten CXCR3+- beziehungsweise CCR5+-CD4+-T-Zellen. ....	81
Tabelle 36: Korrelation zwischen den $\Delta$ CT-Werten von RORc und den % der proliferierten CCR6+- beziehungsweise CD161+-CD4+-T-Zellen. ....	84
Tabelle 37: Korrelation zwischen den $\Delta$ CT-Werten von FoxP3 und den % der CD25+ beziehungsweise CD25+CCR5+ proliferierten CD4+-T-Zellen. ....	87
Tabelle 38: Durchschnittliche Konzentration der Th1-spezifischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS. .	91
Tabelle 39: Durchschnittliche Konzentration der Th17-spezifischen Zytokine IL-17,IL-22 und IL-6 in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS. ....	95
Tabelle 40: Stratifizierung der Werte in low to mediate level IL-6 und high level IL-6 Gruppen mithilfe des Cut-off auf Höhe der 75. Perzentile. ....	96
Tabelle 41 Stratifizierung der Werte in low to mediate level IL-6 und high level IL-6 Gruppen mithilfe des Cut-off auf Höhe der 75. Perzentile. ....	96

Tabelle 42: Durchschnittliche Konzentration der Treg-spezifischen Zytokine IL-10 und IL-2 in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS. ....	98
Tabelle 43: Durchschnittliche Konzentration der Th2-spezifischen Zytokine IL-4,IL-5 und IL-13 und dem Zytokin IL-9 in den verschiedenen Ansätzen bei HD, EM und LS.....	101

## **8. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Beispielhaftes Schaubild über die Pathogenese des immunologisch vermittelten T1DM (Typ-1a).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Therapieformen der intensivierten Insulintherapie.....	6
Abbildung 3: Die Bildung von T-Helferzellen im Rahmen einer Immunantwort.	12
Abbildung 4: Darstellung der CD4+-Subpopulationen. ....	13
Abbildung 5: Epigenetischer Status der spezifischen transkriptionellen Regulator-Gen-Loci in CD4+-T-Zellen. ....	19
Abbildung 6: Ursachen für die Autoimmunität beim T1DM.....	20
Abbildung 7: Falcon-Tube vor und nach der Zentrifugation.....	34
Abbildung 8: 96-Well Platte mit flachem Boden und den gefüllten Wells. ....	37
Abbildung 9: Beispielhaft für eine Versuchsreihe sind 6 gefüllte Wells mit einem unstimulierten Ansatz (Medium), den spezifischen Antigenen und PHA dargestellt.....	37
Abbildung 10: Vorwärtsstreulicht (siehe oben) und Seitenstreulicht (siehe unten). ....	39
Abbildung 11:10-fach vergrößerte mikroskopische Darstellung der Zellen (0: unstimuliert, 1: GAD65, 2: PHA).....	40
Abbildung 12: 20-fach vergrößerte mikroskopische Darstellung der Zellen (0: unstimuliert, 1: GAD65, 2: PHA).....	40
Abbildung 13: Beispiel für die Differenzierung der Th-Subpopulationen mithilfe der BD Software FACS DIVA und Erstellung von Gates. ....	41
Abbildung 14: Prinzip der Zytokinmessung. ....	42
Abbildung 15: Repräsentative Darstellung der Differenzierung der proliferierten CD4+-Lymphozyten aus den PBMCs in Kultur bei einem Gesunden.....	54
Abbildung 16: Repräsentative Darstellung der Differenzierung der proliferierten CD4+-Lymphozyten aus den PBMCs in Kultur bei einem Erstmanifestierten. ....	55
Abbildung 17: Repräsentative Darstellung der Differenzierung der proliferierten CD4+-Lymphozyten aus den PBMCs in Kultur bei einem Langzeiterkrankten.	56

Abbildung 18: Anteil der proliferierten CD4+-T-Zellen an den Lymphozyten in Kultur.....	57
Abbildung 19: Proliferierte CD4+-T-Zellen in Lymphozyten in Kultur.....	58
Abbildung 20: Ratio der proliferierten CD4+-T-Zellen nach Stimulation mit PHA und einem anderen Stimulus.....	60
Abbildung 21: Repräsentative Darstellung der naiven T-Zellen (CD45RA+CD28+), der Gedächtniszellen (CD45RA-CD28+), der T-Effektorzellen (CD45RA-CD28-) und der TEMRA (CD45RA+CD28-) in den CFSE-CD4+-T-Zellen im unstimulierten Ansatz (A), nach Stimulation mit GAD65 (B) und Candida albicans (C). ....	62
Abbildung 22: Anteil der proliferierten CD8+-T-Zellen an den Lymphozyten in Kultur.....	66
Abbildung 23: Repräsentative Darstellung der naiven T-Zellen (CD45RA+CD28+), der Gedächtniszellen (CD45RA-CD28+), der T-Effektorzellen (CD45RA-CD28-) und der TEMRA (CD45RA+CD28-) in den CFSE-CD8+-T-Zellen im unstimulierten Ansatz (A), nach Stimulation mit GAD65 (B) und Candida albicans (C). ....	67
Abbildung 24: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der TEMRA in den proliferierten CD8+-T-Zellen.....	68
Abbildung 25: Durchschnittlicher prozentualer Anteil von CXCR3+ in IAA, CCR6+ in Candida albicans und CD25+CCR5+ in GAD65 an den proliferierten CD4+-T-Zellen .....	71
Abbildung 26: Durchschnittlicher prozentualer Anteil von CXCR3+ in IAA, CCR6+ in GAD65 und Candida albicans an den proliferierten CD4+-T-Zellen.....	75
Abbildung 27: Durchschnittliche $\Delta$ CT-Werte von Tbet (Th1) in den verschiedenen Ansätzen von HD, EM und LS.....	77
Abbildung 28: Durchschnittliche $\Delta$ CT-Werte von RORc (Th17) in den verschiedenen Ansätzen von HD, EM und LS.....	78
Abbildung 29: Durchschnittliche $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 (Treg) in den verschiedenen Ansätzen von HD, EM und LS.....	79



Abbildung 30: Korrelation zwischen den % der CXCR3+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der $\Delta$ CT-Werte von Tbet auf der x-Achse nach Stimulation mit IA2.....	82
Abbildung 31: Korrelation zwischen den % der CCR5+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der $\Delta$ CT-Werte von Tbet auf der x-Achse nach Stimulation mit GAD65 (A) und IAA (B) .....	83
Abbildung 32: Korrelation zwischen den % der CCR6+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der $\Delta$ CT-Werte von Tbet auf der x-Achse nach Stimulation mit IAA (A) und Candida albicans (B). .....	85
Abbildung 33: Korrelation zwischen den % der CD161+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der $\Delta$ CT-Werte von RORc auf der x-Achse nach Stimulation mit IAA (A) und IA2 (B). .....	86
Abbildung 34: Korrelation zwischen den % der CD25+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 auf der x-Achse nach Stimulation mit GAD65. ....	87
Abbildung 35: Korrelation zwischen den % der CCR5+CD25+-T-Zellen in den proliferierten CD4+-T-Zellen auf der y-Achse und der $\Delta$ CT-Werte von FoxP3 auf der x-Achse nach Stimulation Candida albicans. ....	88
Abbildung 36: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ mit dem Median und der Interquartilsabstände. ....	93
Abbildung 37: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IL-17, IL-22, IL-6 mit dem Median und der Interquartilsabstände. ....	97
Abbildung 38: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IL-10 und IL-2 mit dem Median und der Interquartilsabstände. ....	100
Abbildung 39: Darstellung der einzelnen Konzentrationen von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-9 mit dem Median und der Interquartilsabstände. ....	104

## 9. Literaturverzeichnis

1. DDG, *S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes*. 2018, Deutsche Diabetes Gesellschaft e.v.: AWMF. p. 10-30.
2. Gesundheit, B.f. *Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2*. 2018 [cited 2019 08.08.2019]; Available from: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/diabetes.html>.
3. Herold, G., *Innere Medizin*. 2018, w: Herold Gerd. 722-725.
4. AmericanDiabetesAssociation, *Standards of medical care in diabetes* Diabetes care - The Journal of clinical and applied research and education, 2019. **42/1**: p. 1-193.
5. Kerner, W. and J. Brückel, *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. Diabetes und Stoffwechsel, 2010. **5**.
6. Federation, I.D., *Epidemiology & research*. IDF Diabetes Atlas, 2015. **7th Edition**.
7. Tamayo, T., et al., *Diabetes in Europe: an update*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **103**(2): p. 206-17.
8. Rosenbauer, J. and e. al., *Typ-1-Diabetes bei Erwachsenen (Alter ≥ 18 Jahre), Typ-2Diabetes bei Jugendlichen (Alter 11 – 18 Jahre)*. 2017.
9. Rosenbauer, J. and e. al, *Prevalence of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents in Germany*. Diabetologica 2012, 2012. **55**(1): p. 369.
10. Müller-Wieland, D. and J. Kröger, *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2018*, Kirchheim + Co GmbH. p. 16-17.
11. Schlüssel, E. *Diabetes mellitus Typ 1*. 2019 05.08.2019]; Available from: <https://www.gelbe-liste.de/krankheiten/diabetes-typ-1>.
12. Teupe, B., *Die Logik meines Diabetes*. 2011, Bad Mergentheim, Baden Württemberg: Eigenverlag Bernhard Teupe. 1-890.
13. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 69-82.
14. Nauck, M. and A. Petermann, *Diabetologie und Stoffwechsel 2017*. Vol. 12. 2017, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart. 94-100.
15. Mydilak, K. and A. Krebs, *Auto-Antikörper bei Typ-1-Diabetes, Differentialdiagnostik und Risikostratifizierung*. 2015, MVZ Labor Ravensburg, Limbach Gruppe. p. 1-4.
16. Haak, T. and K.D. Palitsch, *Diabetologie für die Praxis*. Vol. 1. 2012: Georg Thieme Verlag KG. 181.
17. Sasaki, Y., et al., *Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, T-bet*. Hum Genet, 2004. **115**(3): p. 177-84.
18. Medizininfo. *Diabetes - Intensive Insulintherapie*. 12.12.2019]; Available from: [http://www.medizininfo.de/diabetes/therapie/intensive\\_insulintherapie.htm](http://www.medizininfo.de/diabetes/therapie/intensive_insulintherapie.htm).
19. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. Vol. 4. 2019, Heidelberg: Springer Spektrum. Einführung, 113,127.
20. Psychrembel. *Immunität*. 2016 [cited 2019 05.09.2019]; Available from: <https://www.psychrembel.de/Immunität/KOAM4>.

21. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. Vol. 2. 2015, Heidelberg, Baden-Württemberg: Springer Spektrum. 4-14,23-26,,63-85, 112-116.
22. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular Immunology*. Vol. 9. 2018: Elsevier. 1-30,220-242,340-348,424-430,433,434.
23. Psychrembel. *Immunsystem*. 2016 [cited 2019 05.09.2019]; Available from: <https://www.psychrembel.de/immunsystem/KOAMH/doc/>.
24. Starr, T., S. Jameson, and K. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annual Review of Immunology, 2003. **21**.
25. Passos, G., et al., *Update on Aire and thymic negative selection*. Immunology, 2018. **153**(1).
26. Singer, A., S. Adoro, and J.-H. Park, *Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4/CD8 lineage choice*. Nat Rev Immunology, 2009. **8**(10): p. 788-801.
27. Carasco, J., et al., *CD45RA on human CD8 T-cells is sensitiv to the time elapsed since the last antigenic stimulation*. Blood, 2006. **108**(9).
28. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues*. Cytometry- Journal of Quantitative Cell Science, 2008. **73A**(11).
29. Loetscher, P., et al., *CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes*. Nature, 1998. **391**: p. 344-345.
30. Kuo, P., et al., *The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer*. Frontiers in Medicine, 2018. **5**: p. 271.
31. Antonelli, A., et al., *CXCR3, CXCL10 and type 1 diabetes*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(1).
32. Turner, J.-E., et al., *CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in Glomerulonephritis*. Journal of the American Society of Nephrology, 2010. **21**(6): p. 974-985.
33. Göschl, L., C. Scheinecker, and M. Bonelli, *Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies*. Semin Immunopathol., 2019. **41**(3).
34. Bedoya, S., et al., *Th17 cells in immunity and autoimmunity*. Clin Dev Immunol, 2013.
35. Dardalhon, V., et al., *Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity*. J Autoimmun, 2008. **31**(3).
36. Dominguez-Villar, M. and D. Hafler, *Regulatory T cells in autoimmune disease*. Nature Immunology, 2018. **19**.
37. Tan, T., et al., *Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review*. Clin Rev Allergy Immunol., 2014. **47**(2).
38. Juedes, A.v.H., MG, *Regulatory T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2004. **20**(6).
39. Tao, J., et al., *Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases*. Inflammation, 2017. **40**(1).
40. Murphy, E., et al., *Reversibility of T helper 1 and 2 popilations is lost after long-term stimulation*. J Exp Med, 1996. **183**(3).
41. Zhou, L., et al., *TGF-β-induced FoxP3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing RORyt function*. Nature, 2008. **453**(7192).

42. Radbruch, A. and H. Schulze-Koops, *Plastizität der Effektorfunktionen von T-Helfer-Lymphozyten*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2009. **68**.
43. Hirahara, K., et al., *Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics*. Immunology, 2011. **134**(3).
44. Wilson, C., E. Rowell, and M. Sekimata, *Epigenetic control of T-helper-cell-differentiation*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**.
45. Kumar, P. and G. Subramaniam, *Molecular underpinnings of Th17 immune-regulation and their implications in autoimmune diabetes*. Elsevier-Cytokine, 2014. **71**(2).
46. Zhou, L., M. Chong, and D. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5).
47. Bending, D., et al., *Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(3).
48. Komatsu, N., et al., *Pathogenic conversion of Foxp3 T-cells into Th17 cells in autoimmune arthritis*. Nature Medicine, 2014. **20**.
49. O'Shea, J. and W. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T-cells*. Science, 2010. **327**(5969).
50. Cosmi, L., et al., *T helper cells plasticity in inflammation*. Cytometry-Journal of Quantitative Cell Science, 2014. **85**(1).
51. Walker, K. and M. Von Herrath, *CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2016. **183**(1).
52. Psychrembel. *Autoimmunität*. 2017 [cited 2019 05.09.2019]; Available from: <https://www.psychrembel.de/Autoimmunität/K038P/doc/>.
53. Martinov, T. and B. Fife, *Type 1 diabetes pathogenesis and the role of inhibitory receptors in islet tolerance*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2019.
54. Burrack, A.L., T. Martinov, and B.T. Fife, *T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 343.
55. Chen, Y.G., C.E. Mathews, and J.P. Driver, *The Role of NOD Mice in Type 1 Diabetes Research: Lessons from the Past and Recommendations for the Future*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 51.
56. Debray-Sachs, M., et al., *Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma*. J Autoimmun, 1991. **4**(2): p. 237-48.
57. Sarvetnick, N., et al., *Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma*. Cell, 1988. **52**(5): p. 773-82.
58. Sobel, D.O., et al., *Gamma interferon paradoxically inhibits the development of diabetes in the NOD mouse*. J Autoimmun, 2002. **19**(3): p. 129-37.
59. Jain, R., et al., *Innocuous IFNgamma induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production*. J Exp Med, 2008. **205**(1): p. 207-18.
60. Emamallee, J.A. and S. Merani, *Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice*. . Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1302-1311.
61. Joseph, J., et al., *IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 216-21.

62. Vukkadapu, S.S., et al., *Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse*. *Physiol Genomics*, 2005. **21**(2): p. 201-11.
63. Li, C.R., E.E. Mueller, and L.M. Bradley, *Islet antigen-specific Th17 cells can induce TNF-alpha-dependent autoimmune diabetes*. *J Immunol*, 2014. **192**(4): p. 1425-32.
64. Reed, J.C. and K.C. Herold, *Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM*. *Nat Rev Endocrinol*, 2015. **11**(5): p. 308-14.
65. Driver, J.P., Y.G. Chen, and C.E. Mathews, *Comparative genetics: synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes*. *Rev Diabet Stud*, 2012. **9**(4): p. 169-87.
66. Homann, D., et al., *Insulin in oral immune "tolerance": a one-amino acid change in the B chain makes the difference*. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 1833-8.
67. Linnea, R.-H., et al., *Th1/Th17 Plasticity Is a Marker of Advanced  $\beta$  Cell Autoimmunity and Impaired Glucose Tolerance in Humans*. *J Immunol*, 2015. **194**(1).
68. Hull, C., M. Peakman, and T. Timothy, *Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it?* *Diabetologia*, 2017. **60**(10).
69. *World Medical Association Declaration of Helsinki*. Journal of the American Medical Association, 2013.
70. *ICH Harmonised Guideline*. International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH), 2016. **E6(R2) addendum**
71. Prelog, M., *Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity?* *Autoimmun Rev*, 2006. **5**(2): p. 136-9.
72. Böyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 1968: p. 77-89.
73. *Trypan Blue solution*. [cited 2019 15.08.2019]; Available from: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154?lang=de&region=DE&gclid=EAlaIQobChMli\\_iu\\_ME5AIVj9CyCh3I6QM3EAMYASAAEgKalfD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154?lang=de&region=DE&gclid=EAlaIQobChMli_iu_ME5AIVj9CyCh3I6QM3EAMYASAAEgKalfD_BwE).
74. Wohnhaas, C., G. Leparc, and F. Fernandez-Albert, *DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing*. *Nature*, 2019. **9**.
75. *Kryokonservierung von eukaryotischen Zellkulturzellen*. *Biologie in unserer Zeit*, 2009. **5**: p. 308.
76. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*. *J Immunol Methods*, 2000. **243**(1-2): p. 147-54.
77. De Boer, R. and A. Perelson, *Estimating division and death rates from CFSE data*. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 2005. **184**(1): p. 140-164.

78. Mannering, S., et al., *CD4+ T Cell Proliferation in Response to GAD and Proinsulin in Healthy, Pre-diabetic and Diabetic Donors*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1037**(1).
79. Carlsson, E., J. Ludvigsson, and K. Huus, *High physical activity in young children suggests positive effects by altering autoantigen-induced immune activity*. Scand J Med Sci Sports., 2016. **4**: p. 441-450.
80. Monti, P., et al., *Evidence for in vivo primed and expanded autoreactive T cells as a specific feature of patients with type 1 diabetes*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5785-92.
81. Dromey, J.A., et al., *Generation and expansion of regulatory human CD4(+) T-cell clones specific for pancreatic islet autoantigens*. J Autoimmun, 2011. **36**(1): p. 47-55.
82. Movafagh, A., et al., *The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedur*. Iran J Pharm Res., 2011. **10**(4).
83. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. 2002, BD Biosciences. p. 1-15.
84. Herzenberg, L.A. and R. Sweer, *Flourescence-activated cell sorting*. Sci Am, 1976. **3**: p. 108-117.
85. Meyer, K. *FACS Facility Labor- Information und Wissenswertes*. [cited 2019 15.08.2019]; Available from: <http://www.genomforschung.hhu.de/facs-facility/facs-infos-und-links.html>.
86. Holschbach, M. *Was ist Durchflusszytometrie (FACS)?* 2013 [cited 2019 22.10.2019].
87. *Zombie Aqua - live cell/dead cell discrimination*. [cited 2019 16.08.2019]; Available from: [https://www.biolegend.com/media\\_assets/literature/images/07-0058-00.pdf](https://www.biolegend.com/media_assets/literature/images/07-0058-00.pdf).
88. *FlowCytomix™ - Multiple Analyte Detection User Guide*. eBioscience p. 1-4, 56-60.
89. eBioscience. *Immunoassay - Product Guide*. [cited 2019 29.10.2019].
90. *RNA and DNA purification - User manual*, M.-N.G.C. KG, Editor. 2018. p. 4-13.
91. *RNA isolation-User manual*, M.-N.G.C. KG, Editor. 2015. p. 2-40.
92. Scientific, T. *Wichtige Informationen zur Real-Time PCR*. [cited 2019 04.09.2019]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html#1>.
93. Szabo, S., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6).
94. Gee, K., et al., *The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders*. Inflamm Allergy Drug Targets., 2009. **8**(1).
95. Maspi, N., A. Abdoli, and F. Ghaffarifar, *Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review*. Pathog Glob Health, 2016. **110**(6): p. 247-260.
96. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.

97. Kuwabara, T., et al., *The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 3908061.
98. Nikoopour, E., S.M. Bellemore, and B. Singh, *IL-22, cell regeneration and autoimmunity*. *Cytokine*, 2015. **74**(1): p. 35-42.
99. Li, Y., Y. Liu, and C.Q. Chu, *Th17 Cells in Type 1 Diabetes: Role in the Pathogenesis and Regulation by Gut Microbiome*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 638470.
100. Lin, S., et al., *Treg cells: a potential regulator for IL-22 expression?* *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(2): p. 474-80.
101. Bayer, A.L., A. Pugliese, and T.R. Malek, *The IL-2/IL-2R system: from basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation*. *Immunol Res*, 2013. **57**(1-3): p. 197-209.
102. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. *Cytokine*, 2015. **74**(1): p. 5-17.
103. Chaudhry, A., et al., *Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation*. *Immunity*, 2011. **34**(4): p. 566-78.
104. Zhu, J., *T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production*. *Cytokine*, 2015. **75**(1): p. 14-24.
105. Gieseck, R.L., 3rd, M.S. Wilson, and T.A. Wynn, *Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis*. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(1): p. 62-76.
106. Noble, J.A., et al., *The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families*. *Am J Hum Genet*, 1996. **59**(5): p. 1134-48.
107. Erlich, H.A., et al., *HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families*. *Nat Genet*, 1993. **3**(4): p. 358-64.
108. 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. 1084-92.
109. Marron, M.P., et al., *Functional evidence for the mediation of diabetogenic T cell responses by HLA-A2.1 MHC class I molecules through transgenic expression in NOD mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13753-8.
110. Von Herrath, M., *A virus-gene collaboration*. *Nature*, 2009. **459**: p. 518-519.
111. Willcox, A., et al., *Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **155**(2): p. 173-81.
112. Palmer, J.P., et al., *Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment*. *Science*, 1983. **222**(4630): p. 1337-9.
113. Solimena, M., et al., *Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1988. **318**(16): p. 1012-20.
114. Rabin, D.U., et al., *Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases*. *J Immunol*, 1994. **152**(6): p. 3183-8.

115. Strom, A., et al., *Cellular interferon- $\gamma$  and interleukin-13 immune reactivity in type 1, type 2 and latent autoimmune diabetes: Action LADA 6*. Cytokine, 2012. **58**(2): p. 148-151.
116. Mannering, S.I., et al., *Current approaches to measuring human islet-antigen specific T cell function in type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(2): p. 197-209.
117. Pflieger, C., et al., *Association of T-cell reactivity with beta-cell function in recent onset type 1 diabetes patients*. J Autoimmun, 2010. **34**(2): p. 127-35.
118. Arif, S., et al., *Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health*. J Clin Invest, 2004. **113**(3): p. 451-63.
119. Brooks-Worrell, B.M., et al., *Peripheral blood mononuclear cells of insulin-dependent diabetic patients respond to multiple islet cell proteins*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5668-74.
120. Gomez-Tourino, I., et al., *T cells in type 1 diabetes: Instructors, regulators and effectors: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2016. **66**: p. 7-16.
121. Varela-Calvino, R., et al., *Apportioning Blame: Autoreactive CD4(+) and CD8(+) T Cells in Type 1 Diabetes*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017. **65**(4): p. 275-284.
122. El-Samahy, M.H., et al., *Expression of CD4(+) CD28(null) T lymphocytes in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: Relation to microvascular complications, aortic elastic properties, and carotid intima media thickness*. Pediatr Diabetes, 2017. **18**(8): p. 785-793.
123. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
124. Brusko, T.M., et al., *Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1407-14.
125. Link, M., et al., *Higher FoxP3 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of GAD65 or IA-2 autoantibody-positive compared with autoantibody-negative persons*. APMIS, 2008. **116**(10): p. 896-902.
126. Shao, S., et al., *Th17 cells in type 1 diabetes*. Cell Immunol, 2012. **280**(1): p. 16-21.
127. Arif, S., et al., *Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death*. Diabetes, 2011. **60**(8): p. 2112-9.
128. Maggi, L., et al., *CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2174-81.
129. Marwaha, A.K., et al., *Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 3814-8.
130. Honkanen, J., et al., *IL-17 immunity in human type 1 diabetes*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1959-67.
131. Bottazzo, G.F., et al., *In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis*. N Engl J Med, 1985. **313**(6): p. 353-60.



132. Itoh, N., et al., *Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2313-22.
133. Coppieters, K.T., et al., *Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients*. J Exp Med, 2012. **209**(1): p. 51-60.
134. Panina-Bordignon, P., et al., *Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1923-7.
135. Knight, R.R., et al., *A distinct immunogenic region of glutamic acid decarboxylase 65 is naturally processed and presented by human islet cells to cytotoxic CD8 T cells*. Clin Exp Immunol, 2015. **179**(1): p. 100-7.
136. Takahashi, K., M.C. Honeyman, and L.C. Harrison, *Cytotoxic T cells to an epitope in the islet autoantigen IA-2 are not disease-specific*. Clin Immunol, 2001. **99**(3): p. 360-4.
137. Skowera, A., et al., *beta-cell-specific CD8 T cell phenotype in type 1 diabetes reflects chronic autoantigen exposure*. Diabetes, 2015. **64**(3): p. 916-925.
138. Tulunay, A., et al., *CD8+CD28-, suppressive T cells in systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2008. **17**(7): p. 630-7.
139. North, M.E., A.D. Webster, and J. Farrant, *Primary defect in CD8+ lymphocytes in the antibody deficiency disease (common variable immunodeficiency): abnormalities in intracellular production of interferon-gamma (IFN-gamma) in CD28+ ('cytotoxic') and CD28- ('suppressor') CD8+ subsets*. Clin Exp Immunol, 1998. **111**(1): p. 70-5.
140. Yarde, D.N., et al., *CD28(-) CD8(+) T cells are significantly reduced and correlate with disease duration in juveniles with type 1 diabetes*. Hum Immunol, 2014. **75**(10): p. 1069-74.
141. Mikulkova, Z., et al., *Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis*. Cell Immunol, 2010. **262**(2): p. 75-9.
142. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 237-43.
143. Pellegrino, M., et al., *Identification and functional characterization of CD8+ T regulatory cells in type 1 diabetes patients*. PLoS One, 2019. **14**(1): p. e0210839.
144. Churlaud, G., et al., *Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 171.
145. Berger, C.T. and C. Hess, *Neglected for too long? - CD8+ Tregs release NOX2-loaded vesicles to inhibit CD4+ T cells*. J Clin Invest, 2016. **126**(5): p. 1646-8.
146. Fergusson, J.R., et al., *CD161<sup>int</sup> CD8+ T cells: a novel population of highly functional, memory CD8+ T cells enriched within the gut*. Mucosal Immunol, 2015 **9**(2): p. 401-413.

147. Coppieters, K.T. and M.G. von Herrath, *Viruses and cytotoxic T lymphocytes in type 1 diabetes*. Clin Rev Allergy Immunol, 2011. **41**(2): p. 169-78.
148. Lohmann, T., et al., *Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2474-80.
149. Hedman, M., et al., *Impaired CD4 and CD8 T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children*. Clin Exp Immunol, 2008. **153**(3): p. 360-8.
150. Yamada, S., et al., *Expression levels of CXC chemokine receptors 3 are associated with clinical phenotype of type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1079**: p. 186-9.
151. Paulissen, S.M., et al., *The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 43-53.
152. Ito, T., et al., *CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut*. Exp Cell Res, 2011. **317**(5): p. 613-9.
153. Ranasinghe, R. and R. Eri, *Pleiotropic Immune Functions of Chemokine Receptor 6 in Health and Disease*. Medicines (Basel), 2018. **5**(3).
154. Bonelli, M., et al., *CCR6 Expression Regulates Arthritis in a T Cell Dependent Manner*. Arthritis Rheum, 2016. **68**(10).
155. Lee, S.M., et al., *Prevention and treatment of diabetes with resveratrol in a non-obese mouse model of type 1 diabetes*. Diabetologia, 2011. **54**(5): p. 1136-46.
156. Ferreira, R.C., et al., *IL-21 production by CD4+ effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients*. Diabetologia, 2015. **58**(4): p. 781-90.
157. Wysocki, C.A., et al., *Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3300-7.
158. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach, *Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 366-76.
159. Kallikourdis, M., et al., *Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 594-9.
160. Kondo, T., H. Takata, and M. Takiguchi, *Functional expression of chemokine receptor CCR6 on human effector memory CD8+ T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 54-65.
161. Wang, X., et al., *Downregulation of T-Cell Transcription Factors in Adult Latent Autoimmune Diabetes with High-Titer Glutamic Acid Decarboxylase Antibody*. Diabetes Therapy, 2019. **10**(3): p. 917-927.
162. Martinez-Hervas, S., et al., *Type 1 diabetic mellitus patients with increased atherosclerosis risk display decreased CDKN2A/2B/2BAS gene expression in leukocytes*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 222.
163. Ivanov, I., et al., *The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.

164. Wang, Z., et al., *Immunological Aspects of Fulminant Type 1 Diabetes in Chinese*. J Immunol Res., 2016.
165. Arif, S., et al., *Peripheral and Islet Interleukin-17 Pathway Activation Characterizes Human Autoimmune Diabetes and Promotes Cytokine-Mediated  $\beta$ -Cell Death*. Diabetes, 2011. **60**(8): p. 2122-2119.
166. Kivling, A., et al., *Diverse foxp3 expression in children with type 1 diabetes and celiac disease*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1150**: p. 273-7.
167. Hoffmann, P., et al., *Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation* European Journal of Immunology, 2009. **39**(4): p. 1088-1097.
168. Li, Y., et al., *Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from people with latent autoimmune diabetes in adults*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2011. **94**(2): p. 242-248.
169. Wei, B. and G. Pei, *microRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(3): p. 175-81.
170. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
171. Roh, T.Y., et al., *The genomic landscape of histone modifications in human T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15782-7.
172. Osorio, F., et al., *DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers*. Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3274-81.
173. Fang, D. and J. Zhu, *Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets*. J Exp Med, 2017. **214**(7): p. 1861-1876.
174. Halminen, M., et al., *Cytokine expression in unstimulated PBMC of children with type 1 diabetes and subjects positive for diabetes-associated autoantibodies*. Scand J Immunol, 2001. **53**(5): p. 510-3.
175. Chatzigeorgiou, A., et al., *The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time*. Ann Med, 2010. **42**(6): p. 426-38.
176. Han, D., et al., *Immune profiling by multiple gene expression analysis in patients at-risk and with type 1 diabetes*. Clin Immunol, 2011. **139**(3): p. 290-301.
177. Strom, A., et al., *Cellular interferon-gamma and interleukin-13 immune reactivity in type 1, type 2 and latent autoimmune diabetes: action LADA 6*. Cytokine, 2012. **58**(2): p. 148-51.
178. Petrich de Marquesini, L.G., et al., *IFN-gamma and IL-10 islet-antigen-specific T cell responses in autoantibody-negative first-degree relatives of patients with type 1 diabetes*. Diabetologia, 2010. **53**(7): p. 1451-60.
179. Foulis, A.K., M. McGill, and M.A. Farquharson, *Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells*. J Pathol, 1991. **165**(2): p. 97-103.
180. Karlsson Faresjo, M.G. and J. Ludvigsson, *Diminished Th1-like response to autoantigens in children with a high risk of developing type 1 diabetes*. Scand J Immunol, 2005. **61**(2): p. 173-9.
181. Gozalbo, D., V. Maneu, and M.L. Gil, *Role of IFN-gamma in immune responses to Candida albicans infections*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 1279-90.

182. Qiao, Y.C., et al., *The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176157.
183. Foss-Freitas, M.C., et al., *Effect of the glycemic control on intracellular cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of type 1 and type 2 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. **82**(3): p. 329-34.
184. Lechleitner, M., et al., *Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors*. J Intern Med, 2000. **248**(1): p. 67-76.
185. Lo, H.C., S.C. Lin, and Y.M. Wang, *The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus*. Clin Biochem, 2004. **37**(8): p. 666-72.
186. Aribi, M., et al., *Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients*. Med Sci Monit, 2007. **13**(8): p. CR372-8.
187. Ryba-Stanisławowska, M., et al., *Elevated Levels of Serum IL-12 and IL-18 are Associated with Lower Frequencies of CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T cells in Young Patients with Type 1 Diabetes*. Inflammation, 2014. **37**(5): p. 1513-1520.
188. Wu, H.P., et al., *Effects of insulin and glucose on cytokine production from peripheral blood mononuclear cells*. Chang Gung Med J, 2008. **31**(3): p. 253-9.
189. Emamaullee, J.A., et al., *Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1302-11.
190. Abdel-Moneim, A., H.H. Bakery, and G. Allam, *The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus*. Biomed Pharmacother, 2018. **101**: p. 287-292.
191. Reinert-Hartwall, L., et al., *Th1/Th17 plasticity is a marker of advanced beta cell autoimmunity and impaired glucose tolerance in humans*. J Immunol, 2015. **194**(1): p. 68-75.
192. Khader, S.A., S.L. Gaffen, and J.K. Kolls, *Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa*. Mucosal Immunol, 2009. **2**(5): p. 403-11.
193. Chen, Z., et al., *Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(9): p. 2936-46.
194. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 942-9.
195. Bradshaw, E.M., et al., *Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4432-9.
196. Ryba-Stanislawowska, M., et al., *The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 205284.
197. Rabinovitch, A. and W.L. Suarez-Pinzon, *Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus*. Rev Endocr Metab Disord, 2003. **4**(3): p. 291-9.

198. Kristiansen, O.P. and T. Mandrup-Poulsen, *Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?* Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S114-24.
199. Wilson, N.J., et al., *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells.* Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 950-7.
200. Dandona, P., et al., *Anti-inflammatory effects of insulin and the pro-inflammatory effects of glucose.* Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **18**(4): p. 293-301.
201. Hyun, E., et al., *Insulin modulates protease-activated receptor 2 signaling: implications for the innate immune response.* J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2702-9.
202. Qiao, Y., et al., *Changes of regulatory T cells, transforming growth factor-beta and interleukin-10 in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis.* Clin Immunol, 2016. **170**: p. 61-69.
203. Haseda, F., et al., *CD4(+) CD45RA(-) FoxP3high activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes.* Clin Exp Immunol, 2013. **173**(2): p. 207-16.
204. Jia, S., et al., *Investigation of the change of CD4~+ T cell subset from children with type 1 diabetes.* Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2010. **30**(4): p. 309-314.
205. Rapoport, M.J., et al., *TH1/TH2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients.* Cytokine, 2005. **30**(5): p. 219-27.
206. Zelante, T., et al., *Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 161.
207. Boyman, O. and J. Sprent, *The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 180-90.
208. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2.* Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 453-79.
209. Rosenzweig, M., et al., *Interleukin 2 in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes.* Curr Diab Rep, 2014. **14**(12): p. 553.
210. Hulme, M.A., et al., *Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes.* Diabetes, 2012. **61**(1): p. 14-22.
211. Khoryati, L., S. Kumari, and M. Bogdani, *Selectively Agonizing Treg in Type 1 Diabetes with IL-2 Muteins.* Diabetes, 2018. **67**(1).
212. Dendrou, C.A., et al., *Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource.* Nat Genet, 2009. **41**(9): p. 1011-5.
213. Garg, G., et al., *Type 1 Diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4+CD25+ regulatory T-cell function.* J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4644-4653.
214. Rabinovitch, A. and S.-P. WL, *Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus.* Biochem Pharmacol, 1998. **55**(8): p. 1139-49.
215. Ryden, A., et al., *Switch from a dominant Th1-associated immune profile during the pre-diabetic phase in favour of a temporary increase of a Th3-*

- associated and inflammatory immune profile at the onset of type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev, 2009. 25(4): p. 335-43.*
216. Jansky, L., P. Reymanova, and J. Kopecky, *Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by Borrelia.* Physiol Res, 2003. **52**(6): p. 593-8.
  217. Schirmer, M., et al., *The causes and consequences of variation in human cytokine production in health.* Curr Opin Immunol, 2018. **54**: p. 50-58.
  218. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells.* Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 129-38.

## **10. Anhang**

### **10.1. Danksagung**

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Martina Prelog, die mir stets zuverlässig mit Mut zusprechendem Rat zur Verfügung stand und Ihre Faszination und Freude an der Wissenschaft weitergegeben hat. Ihre sorgfältige Korrektur und die hilfreichen Hinweise haben meine Dissertation inhaltlich und formal enorm bereichert. Besonders bedanken möchte ich mich für ihr ausgezeichnetes Empfehlungsschreiben und ihre Unterstützung bei der Bewerbung für ein Stipendium der Deutschen Diabetes Gesellschaft zur Teilnahme am EASD 2017 in Lissabon.

Ein großer Dank gilt außerdem PD Dr. rer. nat. Giovanni Almanzar, der mir das sorgfältige und gewissenhafte Arbeiten im Labor beigebracht und mich beim Durchführen der Versuche mit seinem großen Wissensschatz unterstützt hat.

Für die statistische Beratung bedanke ich mich bei Viktoria Rücker, die mir geholfen hat die richtigen Verfahren und statistischen Tests anzuwenden. Bedanken möchte ich mich auch bei Herr Dr. Rupert Wößner, Herr Prof. Dr. Martin Fassnacht und bei der Praxis Dr. med. Werner Stürmer, die mir die Rekrutierung der Patienten ermöglichten. Ein weiterer Dank gilt meinen Laborkollegen für anregende Diskussionen und Madeleine Titeux für das tadellose Korrekturlesen. Außerdem möchte ich mich besonders bei den Patientinnen und Patienten und deren Eltern bedanken, die bereit waren, an der Studie teilzunehmen.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meiner Ehefrau Vanessa Jakob für das außerordentliche Verständnis und die tägliche unermüdliche Unterstützung. Dank der motivierenden Worte konnte ich diese Arbeit ohne Rückschläge erfolgreich abschließen.

## 10.2. Lebenslauf

<b><u>Persönliche Daten</u></b>	geboren in Sonthofen
<b><u>Schulbesuch</u></b>	Parler-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
2003-2012	Abschluss Juni 2012: Abitur (Abschluss: 1,2)
<b><u>Studium</u></b>	Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2012-2019	Studium der Humanmedizin
September 2014	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Abschluss: 2,0)
WS 2017/2018	Forschungssemester
April 2018	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Abschluss: 3,0)
Juni 2019	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Abschluss: 2,0)
<b><u>Weiterbildung</u></b>	
Ab Februar 2020	Assistenzärztin mit Weiterbildung der Inneren Medizin am St. Josefskrankenhaus in Heidelberg
<b><u>Stipendiate</u></b>	
Mai 2015	Reisestipendium der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) zum Diabetes Kongress, Berlin
Mai 2016	Reisestipendium der DDG zum Diabetes Kongress, Berlin
November 2016	Reisestipendium der DDG zur Herbsttagung, Nürnberg
September 2017	Reisestipendium der DDG zum 53. Treffen der EASD (European Association for the Study of Diabetes), Lissabon
November 2017	Reisestipendium der DDG zur Herbsttagung, Mannheim
September 2019	Reisestipendium der DDG zum 55. Treffen der EASD (European Association for the Study of Diabetes), Barcelona



## Praktika

April 2010	BoGy in der Kinderarztpraxis Frau Dr. Spengler-Gräbner mit Schwerpunkt Diabetes, Schwäbisch Gmünd
August 2010	Apotheke „Carmer 7“, Berlin
August 2011	Stauferklinikum, Mutlangen
2012 - 2019	verschiedene Praktika im Rahmen des Medizinstudiums
August 2017	Hospitation im Diabetesjugendcamp im Diabeteszentrum Bad Mergentheim
Oktober 2017	Hospitation im Diabeteskindercamp im Diabeteszentrum Bad Mergentheim

Leimen, den 27.01.2020

Lena Marie Jakob