

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Diabetesforschung, Helmholtz Zentrum München
Lehrstuhl Diabetes und Gestationsdiabetes der Technischen Universität München
(Leitung: Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler)

**Durchflusszytometrische Untersuchung des zellulären Immunsystems bei Kindern
mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes**

Philipp Emanuel Sahn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler
2. Prof. Dr. Stefan Burdach

Die Dissertation wurde am 28.03.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 03.01.2018 angenommen.

Durchflusszytometrische Untersuchung des zellulären
Immunsystems bei Kindern mit neu manifestiertem
Typ-1-Diabetes

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG: ZELLULÄRE PATHOGENESE DES TYP-1-DIABETES..... | 7 |
| 2 | ZIELSETZUNG: UNTERSUCHUNG DES ZELLULÄREN IMMUNSYSTEMS BEI DER MANIFESTATION DES TYP-1-DIABETES | 11 |
| 3 | GRUNDLAGEN..... | 15 |
| 3.1 | EPIDEMIOLOGIE UND BEDEUTUNG DES TYP-1-DIABETES | 15 |
| 3.2 | B-LYMPHOZYTEN | 16 |
| 3.2.1 | B-Lymphozyten und der Typ-1-Diabetes | 16 |
| 3.2.2 | Regulatorische B-Lymphozyten | 17 |
| 3.2.3 | Aktivierte B-Lymphozyten | 20 |
| 3.3 | NATÜRLICHE KILLERZELLEN..... | 22 |
| 3.3.1 | Physiologie und Unterteilung der Natürlichen Killerzellen..... | 22 |
| 3.3.2 | Natürliche Killerzellen und der Typ-1-Diabetes | 23 |
| 3.3.3 | Oberflächenrezeptoren der Natürlichen Killerzellen und ihre Eigenschaften | 24 |
| 3.4 | MONOZYTEN..... | 27 |
| 3.4.1 | Monozyten-Untergruppen und ihre Veränderungen beim Typ-1-Diabetes..... | 27 |
| 3.4.2 | Expression von Siglec-1 auf Monozyten | 28 |
| 3.5 | MYELOIDE SUPPRESSORZELLEN | 30 |
| 3.5.1 | Myeloide Suppressorzellen bei Autoimmunerkrankungen | 30 |
| 4 | MATERIAL UND METHODEN | 33 |
| 4.1 | DIE KOHORTENSTUDIE DIMELLI | 33 |
| 4.2 | DIE KOHORTENSTUDIE TEENDIAB..... | 34 |
| 4.3 | AUSWAHLKRITERIEN FÜR PROBEN AUS DEN BEIDEN KOHORTENSTUDIEN DIMELLI UND TEENDIAB | 36 |
| 4.4 | AUFTAUEN DER STUDIENZELLEN | 38 |
| 4.5 | ANTIKÖRPER-VERMITTELTE FÄRBUNG DER UNTERSUCHTEN IMMUNZELLEN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 38 |
| 4.5.1 | Verwendetes Färbepanel..... | 40 |
| 4.5.2 | Messung und Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometer | 42 |
| 4.5.3 | Gating-Strategien für die verschiedenen Populationen | 43 |
| 4.6 | STATISTISCHE ANALYSE..... | 49 |
| 5 | ERGEBNISSE..... | 50 |
| 5.1 | B-LYMPHOZYTEN | 50 |
| 5.2 | NATÜRLICHE KILLERZELLEN..... | 54 |
| 5.3 | MONOZYTEN..... | 56 |
| 5.4 | MYELOIDE SUPPRESSORZELLEN | 58 |
| 5.5 | AUSWIRKUNG DER ANZAHL DER TRANSITIONALEN B-LYMPHOZYTEN AUF DEN TYP-1-DIABETES | 59 |
| 5.6 | ÜBERBLICK ÜBER DIE MESSERGEBNISSE | 61 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6 | DISKUSSION | 63 |
| 6.1 | DISKUSSION DER METHODEN | 64 |
| 6.2 | VERMINDERUNG DER TRANSITIONALEN B-LYMPHOZYTEN BEI TYP-1-DIABETIKERN | 65 |
| 6.3 | KEINE VERÄNDERUNG DER CD21LOW B-LYMPHOZYTEN BEI TYP-1-DIABETIKERN..... | 68 |
| 6.4 | KEINE VERÄNDERUNG IN DER MONOZYTENVERTEILUNG BEI TYP-1-DIABETIKERN..... | 69 |
| 6.5 | KEINE VERÄNDERUNG DER EXPRESSION VON SIGLEC-1 AUF MONOZYTEN BEI TYP-1-DIABETIKERN | 70 |
| 6.6 | KEINE VERÄNDERUNG DER MYELOIDEN SUPPRESSORZELLEN BEI TYP-1-DIABETIKERN | 70 |
| 6.7 | KEINE VERÄNDERTE REZEPTOR-EXPRESSION AUF NATÜRLICHEN KILLERZELLEN BEI TYP-1-DIABETIKERN | 71 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG | 73 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 76 |
| 9 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 87 |
| 10 | TABELLENVERZEICHNIS | 88 |
| 11 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 89 |
| 12 | DANKSAGUNG | 91 |

Diese Arbeit wurde durch eine allgemeine Projektförderung der Deutschen Diabetes Gesellschaft gefördert.

1 Einleitung: Zelluläre Pathogenese des Typ-1-Diabetes

Der Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die durch die Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas gekennzeichnet ist. In der Folge des Betazell-Untergangs kommt es zu einem Insulinmangel mit Hyperglykämie, die zu sekundären Endorganschäden wie Retinopathie und Nephropathie führt. Die Schädigung der Betazellen wird nach herrschender Meinung vornehmlich durch T-Lymphozyten vermittelt (Phillips, Parish et al. 2009, Todd 2010, van Belle, Coppieters et al. 2011). Es ist bekannt, dass eine Störung der Toleranz gegenüber Selbstantigenen Bestandteil der Pathogenese des T1D ist (Feuerer, Shen et al. 2009). Entsprechend fokussiert sich die Forschung auf T-Lymphozyten und vor allem auf die Unterart der regulatorischen T-Lymphozyten (ElEssawy und Li 2015).

Trotz der Hauptrolle der T-Lymphozyten gibt es gute Evidenz dafür, dass die Schädigung der Betazellen von anderen Immunzellen im Sinne immunologischer Interaktionen initiiert (Willcox, Richardson et al. 2009), verstärkt oder abgeschwächt wird (Lehuen, Diana et al. 2010). Diese mitbeteiligten Immunzellen finden sich sowohl im adaptiven Immunsystem in Form von B-Lymphozyten (Pescovitz, Greenbaum et al. 2009, Lehuen, Diana et al. 2010), als auch im angeborenen Immunsystem in Form von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten (Rodacki, Svoren et al. 2007, Lehuen, Diana et al. 2010, Gur, Enk et al. 2011, Irvine, Gallego et al. 2012).

Die prominentesten Vertreter dieser mitbeteiligten Immunzellen sind die B-Lymphozyten, welche zu Plasmablasten oder Plasmazellen ausdifferenzieren können. Die Produktion von Autoantikörpern gegen die Inselzellantigene Insulin, Tyrosinphosphatase IA-2, Glutamatdecarboxylase 65 und Zinktransporter 8 (Ziegler, Ziegler et al. 1989, Grubin, Daniels et al. 1994, Bonifacio, Lampasona et al. 1995, Wenzlau, Juhl et al. 2007) ist charakteristisch für den T1D und eine der frühesten nachweisbaren pathologischen Veränderungen. Mit der Anzahl der o.g. verschiedenen Antikörper steigt die Wahrscheinlichkeit der Progression zum T1D bei prädiabetischen Individuen (Ziegler, Rewers et al. 2013), auch wenn sie selber nach heutigem Wissensstand keine destruktive Wirkung auf Inselzellen besitzen (Sibley, Sutherland et al. 1985, Bingley 2010). Die ätiologische Bedeutung der B-Lymphozyten wurde auch anhand ihrer Depletion gezeigt:

So verlängert die selektive Depletion von B-Lymphozyten mittels des gegen CD20 gerichteten Antikörpers Rituximab das diabetesfreie Überleben signifikant beim etablierten Tiermodell des T1D, der Non-Obese Diabetic (NOD)-Maus (Hu, Rodriguez-Pinto et al. 2007, Fiorina, Vergani et al. 2008, Xiu, Wong et al. 2008). Auch beim Menschen erhält Rituximab eine signifikant höhere C-Peptid-Ausschüttung, als Marker der endogenen Insulinproduktion, für mindestens ein Jahr aufrecht (Pescovitz, Greenbaum et al. 2009).

Die Rolle der NK-Zellen beim T1D wurde ebenfalls an der NOD-Maus gezeigt: In diesem Tiermodell verhindert die Blockade des Rezeptors NKp46 auf natürlichen Killerzellen die Entstehung des T1D (Gur, Porgador et al. 2010). Weiterhin kann von NK-Zellen produziertes Interferon- γ (IFN- γ) direkt bei Betazellen die Apoptose auslösen und indirekt die Autoimmunreaktion verstärken, indem es die Expression des Major Histocompatibility Complexes I (MHC-I) und damit die Präsentation von Selbstantigenen auf Betazellen verstärkt (Eizirik, Colli et al. 2009, Lehuen, Diana et al. 2010). Bei Menschen mit T1D ließ sich im Zusammenhang mit einer Infektion der Inselzellen durch das Coxsackie B4-Virus in histologischen Proben eine Invasion der Inselzellen durch NK-Zellen beobachten (Dotta, Censini et al. 2007).

Auch bei Monozyten sind bei Typ-1-Diabetikern Auffälligkeiten beschrieben. So findet sich bei Typ-1-Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine numerische Verminderung in den CD14^{high}CD16⁺ exprimierenden Monozyten mit einer gleichzeitigen Vermehrung von CD14^{low}CD16⁻ Monozyten (Irvine, Gallego et al. 2012). Diese Abweichung von der normalen Verteilung lässt sich nicht nur bei Typ-1-Diabetikern nachweisen, sondern in geringerem Umfang auch schon bei nicht-diabetischen Verwandten ersten Grades (Irvine, Gallego et al. 2012). Eine andere Studie untersuchte die Expression von Interferon-induzierbaren Genen bei Kindern mit genetischem Risiko für den T1D. Es konnte gezeigt werden, dass die übermäßige Expression dieser Gene noch vor dem Auftreten der ersten Autoantikörper geschah und einen Risikofaktor für die darauffolgende Entwicklung von Autoantikörpern und eines T1D darstellte. Durch die Expression dieser Gene wurde charakteristischerweise der Oberflächenrezeptor Siglec-1 auf Monozyten transient überexprimiert (Ferreira et al. 2014). Es fehlen jedoch Daten zur

Expression von Siglec-1 (und damit der Expression der INF-induzierbaren Gene) zum Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation des T1D.

Nicht zuletzt findet sich eine bedeutende Beteiligung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems abseits der T-Lymphozyten auch organspezifisch im Pankreas. Eine histologische Analyse posthum gewonnener Pankreata von unmittelbar an T1D Verstorbenen zeigte neben der Infiltration der Langerhans-Inseln durch T-Lymphozyten auch Makrophagen, NK-Zellen und B-Lymphozyten (Willcox, Richardson et al. 2009) in unterschiedlichem Ausmaß, je nach Stadium der Betazell-Zerstörung.

In den letzten Jahren wurden bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen neue Typen von Immunzellen mit immunregulatorischen und proinflammatorischen Wirkungen beschrieben und erforscht. Dazu zählen die im Folgenden vorgestellten Untergruppen von B-Lymphozyten und Myeloiden Suppressorzellen (MDSC). Daten zur Verteilung dieser Zellen beim T1D fehlen zum jetzigen Zeitpunkt, oder wurden nur an Tiermodellen oder in wenigen Studien am Menschen untersucht.

Transitionale B-Lymphozyten mit dem Phänotyp CD19+CD27-CD24^{hi}CD38^{hi} stellen eine unreife Entwicklungsstufe von B-Lymphozyten dar (Sims, Ettinger et al. 2005, Palanichamy, Barnard et al. 2009, Vossenkamper und Spencer 2011), haben aber mittels der Freisetzung des immunsuppressiven (Couper, Blount et al. 2008) Interleukin-10 und weiterer Mechanismen auch eine immunregulatorische Funktion (Mauri und Blair 2010, Mauri und Menon 2015). Es wurden bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen Veränderungen an diesen Zellen beobachtet. So sind sie bei der rheumatoiden Arthritis numerisch vermindert (Flores-Borja, Bosma et al. 2013), beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) in ihrer Funktion eingeschränkt (Blair, Norena et al. 2010) und zeigen beide Veränderungen bei der autoimmunen Thrombozytopenie (Li, Zhong et al. 2012). Die Wirkung von Rituximab beim T1D (s.o.) wurde von einigen Autoren durch die Depletion der B-Lymphozyten und das anschließende massenhafte Auftreten von transitionalen B-Lymphozyten (Palanichamy, Barnard et al. 2009) in ihrer Doppelrolle als Entwicklungsstufe von B-Lymphozyten und als immunregulatorische Zellen (Fiorina, Vergani et al. 2008, Mauri 2010, Kleffel, Vergani et al. 2014) erklärt. Eine andere potentiell immunregulatorische Untergruppe von B-Lymphozyten (CD19+CD27+CD24+) vermittelt

ihre Wirkung ebenfalls über die Produktion von IL-10 und wird in Anlehnung an den analogen Zelltyp bei Mäusen als B10 bezeichnet. Es zeigen sich numerische Veränderungen dieses Zelltyps bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Iwata, Matsushita et al. 2011), aber es fehlen Untersuchungen beim T1D.

Beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) wird im Schub die Expansion von aktivierten B-Lymphozyten (Rakhmanov, Keller et al. 2009) mit der niedrigen Expression von CD21 (CD21low) beobachtet (Wehr, Eibel et al. 2004). Auch beim primären Sjögren-Syndrom oder der Granulomatose mit Polyangiitis finden sich CD21low B-Lymphozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt im peripheren Blut (Wehr, Eibel et al. 2004), ebenso bei Patienten mit variablem Immundefektsyndrom mit zusätzlichen Autoimmunphänomenen (Warnatz, Denz et al. 2002).

Die vor allem im Zusammenhang mit der Charakterisierung der zellulären Umgebung von Tumoren (Gabilovich und Nagaraj 2009) erforschten MDSC vom granulozytären Typ (G-MDSC) zeigten sich ursächlich für die Auflösung der zentralnervösen Entzündung bei der schubweise verlaufenden Multiplen Sklerose (Ioannou, Alissafi et al. 2012). Murine MDSC können den T1D bei der NOD/SCID (severe combined immunodeficiency)-Maus verhindern, indem sie autoreaktive zytotoxische T-Lymphozyten in Anergie versetzen (Yin, Ma et al. 2010).

2 Zielsetzung: Untersuchung des zellulären Immunsystems bei der Manifestation des Typ-1-Diabetes

Ziel dieser Arbeit war es, das zelluläre Immunsystem abseits der T-Lymphozyten beim T1D zu untersuchen, mit einem Fokus auf pro- und antiinflammatorische Immunzellen, die beim T1D eine ätiologische Bedeutung haben könnten, aber bisher beim Menschen noch nicht oder nur in wenigen Studien untersucht wurden. Der Hauptteil der Untersuchung beschäftigte sich mit B-Lymphozyten angesichts ihrer prominenten Rolle in der Pathogenese des T1D. Neben den bereits genannten Untergruppen von B-Lymphozyten sollten auch Ausreifungsstufen der B-Lymphozyten-Entwicklung betrachtet werden. Daneben sollten NK-Zellen, Monozyten und MDSC untersucht werden.

Spezifische Fragestellungen der Arbeit:

- 1) Gibt es bei Typ-1-Diabetikern im Vergleich zu Gesunden zahlenmäßige Veränderungen der B-Lymphozyten, insbesondere bei den proinflammatorischen CD21^{low} oder den antiinflammatorischen transitionalen B-Lymphozyten und B10? Gibt es zahlenmäßige Veränderungen bei den Ausreifungsstufen Plasmablasten und IgD⁺IgM⁺ B-Lymphozyten?
- 2) Sind NK-Zellen bei Typ-1-Diabetikern im Vergleich zu Gesunden verändert aktiviert bzw. exprimieren sie in verändertem Maße aktivierende oder inhibierende Oberflächenrezeptoren?
- 3) Wird Siglec-1 auf Monozyten von Typ-1-Diabetikern im Vergleich zu Gesunden vermehrt exprimiert? Lässt sich die von *Irvine, Gallego et al. (2012)* vorgeschriebene Veränderung der Monozyten-Untergruppen reproduzierbar beobachten?
- 4) Gibt es bei Typ-1-Diabetikern im Vergleich zu Gesunden zahlenmäßige Veränderungen der G-MDSC?

Es sollte mittels Durchflusszytometrie überprüft werden, ob die Häufigkeit dieser Zellen im peripheren Blut von Kindern mit neu manifestiertem T1D anders ist als bei gleichaltrigen Kindern ohne T1D. Diese Untersuchungen wurden mittels zweier Studienkohorten des Instituts für Diabetesforschung, Helmholtz Zentrum München,

realisiert. Die Kinder mit neu manifestierten T1D entstammten der bayerischen Diabetesregisterstudie DiMelli; die Kinder ohne Diabetes entstammten der prospektiven TEENDIAB-Studie.

Gegenwärtig ist bei keinem der genannten Immunzelltypen das Auftreten unmittelbar um den Zeitpunkt der Erstdiagnose des T1D untersucht. Hier könnten noch ätiologisch bedeutsame Veränderungen in den Zellpopulationen zu beobachten sein, ohne dass die immunkompromittierenden Effekte eines lange bestehenden T1D die Analyse stark beeinflussen. Mit der Untersuchung der in Tabelle 1 genannten Zellpopulationen soll diese Arbeit dazu beitragen, neue zelluläre Ziele für weitere experimentelle und klinische Forschung zu suchen.

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Zellpopulationen und Marker mit kurzer Beschreibung der Funktion und Referenz.

| Zellpopulation | Funktion/ Auftreten bei Autoimmunerkrankungen | Referenz |
|---|--|---|
| Transitionale B-Lymphozyten | Mittels Freisetzung von IL-10 immunsuppressiver Zelltyp | (Mauri und Menon 2015) |
| Untersuchter Phänotyp: CD19+ CD27- CD24hiCD38hi | Numerisch vermindert bei Rheumatoider Arthritis. | (Flores-Borja, Bosma et al. 2013) |
| | Funktionell eingeschränkt beim SLE | (Blair, Norena et al. 2010) |
| | Höhere Anzahl ist mit verlängertem Organüberleben nach Nierentransplantation assoziiert. | (Newell, Asare et al. 2010) |
| | Numerisch vermindert und funktionell eingeschränkt bei der autoimmunen Thrombozytopenie. | (Li, Zhong et al. 2012) |
| B10 | Mittels Freisetzung von IL-10 immunsuppressiver Zelltyp | (Iwata, Matsushita et al. 2011) |
| Untersuchter Phänotyp: CD19+CD27+CD24+ | Veränderung bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen | |
| Granulozytäre Myeloide Suppressorzellen (G-MDSC) | MDSC sind eine heterogene Gruppe von Vorläuferzellen der Myeloischen Reihe mit immunsuppressiver Wirkung | (Gabrilovich und Nagaraj 2009, Ioannou, Alissafi et al. 2012) |
| Untersuchter Phänotyp: HLA-DR-/low CD14-CD33+CD15+ | Expansion von G-MDSC bei Encephalitis disseminata kurz vor Auflösung der Entzündung und daran ursächlich beteiligt | (Ioannou, Alissafi et al. 2012) |
| | Suppression des Typ-1-Diabetes bei der NOD-Maus durch MDSC | (Yin, Ma et al. 2010) |
| Plasmablasten | Sich stark teilender Vorläufer von Plasmazellen | (Wehr, Eibel et al. 2004) |
| Untersuchter Phänotyp: CD19+ CD27+CD38 | Expansion bei SLE korreliert mit Krankheitsaktivität. | |
| CD21low B-Lymphozyten | Proinflammatorischer Zelltyp mit Expansion beim SLE | (Wehr, Eibel et al. 2004) |
| Untersuchter Phänotyp: CD19+CD21low mit Expression von CD86/CD95/IgD | Expansion beim Variablen Immundefektsyndrom (CVID) | (Rakhmanov, Keller et al. 2009) |
| | V.a. bei CVID mit zusätzlichen Autoimmunphänomenen | (Warnatz, Wehr et al. 2002) |
| | CD86, CD95, IgD auf CD21low B-Lymphozyten korrelieren mit Krankheitsaktivität | (Bijl, Horst et al. 2001, Wehr, Eibel et al. 2004) |
| Untergruppen von CD14 und CD16 exprimierenden Monozyten | Gestörte Verteilung bei Typ-1-Diabetikern und Verwandten ersten Grades | (Irvine, Gallego et al. 2012) |
| Untersuchter Phänotyp: CD3- CD14+/- CD16+/- | | |

| | | |
|---|--|---|
| Siglec-1-Expression auf Monozyten Untersucher Phänotyp: CD3-CD14+ CD16+ Siglec-1+ | Zeichen der Expression von IFN- α -induzierbaren Genen. Verstärkt exprimiert bei viralen Infekten bei Risikopersonen für T1D noch vor dem Auftreten von Auto-Antikörpern. | (Ferreira, Guo et al. 2014) |
| NK-Zellen | Infiltration der Langerhans-Inseln beim Menschen. Beteiligt an der Entzündungsreaktion, v.a. in Verbindung mit einer Coxsackie B4-Virus-Infektion. | (Dotta, Censini et al. 2007, Willcox, Richardson et al. 2009) |

3 Grundlagen

3.1 Epidemiologie und Bedeutung des Typ-1-Diabetes

Ein genaueres Verständnis der Pathogenese und die Identifikation neuer therapeutischer Ziele sind, besonders vor dem Hintergrund der weltweit steigenden Inzidenz und der gesundheitlichen Auswirkungen der Erkrankung, von besonderer Bedeutung. Vor allem in nordeuropäischen Ländern und Nordamerika liegt eine hohe Prävalenz vor (Karvonen, Viik-Kajander et al. 2000). Darüber hinaus wird eine jährliche Zunahme der Inzidenz um ca. 3-4% in Europa beobachtet (Lehuen, Diana et al. 2010, Patterson, Gyurus et al. 2012). In Deutschland beträgt die Inzidenz etwa 19 pro 100.000 Einwohner und es zählt somit zu den Hochrisikoländern (Ehehalt, Dietz et al. 2010). So ist der T1D die häufigste Stoffwechselerkrankung des Kindesalters (Danne und Neu 2012). Zusätzlich ist eine Linksverschiebung des Manifestationsalters zu jüngeren Kindern zu beobachten (Ehehalt, Dietz et al. 2010, van Belle, Coppieters et al. 2011).

Um zu überleben, sind die Patienten lebenslang auf eine exogene Insulinzufuhr angewiesen. Der Erfolg der Insulin-Therapie ist stark abhängig von der Qualität der Durchführung und kann den Blutzucker nicht immer in den physiologischen Grenzen halten, so dass es zu Episoden von Hyper- und auch Hypoglykämie kommt.

Hyperglykämie mit Ketoazidose und schwere Hypoglykämie sind nicht nur akut bedrohliche Ereignisse, es kommt zusätzlich längerfristig zu mikrovaskulären und makrovaskulären Sekundärkomplikationen (The Diabetes Control and Complications Trial 1993), wie z.B. diabetischer Retinopathie (Cheung, Mitchell et al. 2010), Nephropathie (Osterby, Hartmann et al. 2002) und koronarer Herzerkrankung (Fuller, Shipley et al. 1980). Es wird eine Verminderung der Lebenserwartung um etwa 10 Jahre beobachtet, selbst bei guter Einstellung (van Belle, Coppieters et al. 2011). Eine schlechtere gesundheitsbezogene Lebensqualität geht damit einher (Zdunczyk, Sendela et al. 2014, Mellerio, Guilmin-Crepon et al. 2015).

3.2 B-Lymphozyten

3.2.1 B-Lymphozyten und der Typ-1-Diabetes

B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen produzieren beim T1D Autoantikörper gegen spezifische Strukturen von Betazellen, nämlich gegen Insulin (Ziegler, Ziegler et al. 1989), Tyrosinphosphatase (Bonifacio, Lampasona et al. 1995), Glutamatdecarboxylase 65 (Grubin, Daniels et al. 1994) und Zinktransporter 8 (Wenzlau, Juhl et al. 2007). Diese Antikörper haben nach heutiger Erkenntnis keine destruktive Wirkung auf die Betazellen (Sibley, Sutherland et al. 1985, Bingley 2010), sind aber Anzeichen des Bruchs der peripheren Toleranz und Marker des Autoimmunprozesses (Bingley 2010). Mit der Anzahl der o.g. verschiedenen Antikörper steigt die Wahrscheinlichkeit der Progression zum T1D bei prädiabetischen Individuen (Ziegler, Rewers et al. 2013). Diese Autoantikörper sind teilweise mehrere Jahre vor dem Ausbruch des T1D vorhanden. Das frühe Auftreten von Auto-Antikörpern impliziert eine Rolle für B-Lymphozyten (bzw. Plasmazellen) in den frühen autoimmunologischen Ereignissen (van Belle, Coppieters et al. 2011).

Der unmittelbare Beitrag der B-Lymphozyten zur Pathogenese des T1D, der über die Produktion von Antikörpern hinausgeht, lässt sich unter anderem auch durch die Wirkung von Rituximab zeigen. Dies ist ein therapeutisch eingesetzter monoklonaler Antikörper gegen CD20, der selektiv B-Lymphozyten depletiert und klinisch zur Behandlung von malignen Lymphomen etabliert ist (Maloney 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Rituximab bei neu diagnostizierten Typ-1-Diabetikern zu einer erhöhten Insulineigenproduktion führte. Patienten hatten ein Jahr nach Rituximab-Gabe signifikant höhere residuale C-Peptid-Ausschüttung sowie bessere HbA1c-Werte als Patienten der Placebo-Gruppe (Pescovitz, Greenbaum et al. 2009). Im zweiten Jahr des Untersuchungszeitraums, in dem keine weiteren Rituximab-Gaben erfolgten, glichen sich jedoch C-Peptid-Ausschüttung und HbA1c-Werte zwischen der Rituximab-Gruppe und der Placebo-Gruppe an (Pescovitz, Greenbaum et al. 2014).

Die herrschende Meinung zur Rolle der B-Lymphozyten in der Pathogenese des T1D ist, dass sie als sekundäre antigenpräsentierende Zellen den Autoimmunprozess vorantreiben (Silveira, Johnson et al. 2002, Wong, Wen et al. 2004, Thompson, Pekalski et al. 2014). Beim Menschen finden sich CD20+ B-Lymphozyten in den Langerhans-Inseln vor allem

gegen Ende der Insulitis bei fortgeschrittenem Betazell-Untergang (Willcox, Richardson et al. 2009).

3.2.2 Regulatorische B-Lymphozyten

In Analogie zu T-Lymphozyten, die neben zytotoxischen auch regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}) umfassen, welche die Immunantwort supprimieren, wurden in letzter Zeit auch Populationen von B-Lymphozyten beschrieben, die eine immunregulatorische und -suppressive Wirkung ausüben. Diese werden unter dem Begriff regulatorische B-Lymphozyten (B_{reg}) zusammengefasst (Mauri und Menon 2015).

Die beiden am besten untersuchten Gruppen von B_{reg} lassen sich anhand ihrer Expression des Memory-Lymphozyten-Markers CD27 (Agematsu, Hokibara et al. 2000) als Populationen von unreifen B-Lymphozyten und Gedächtnis-B-Lymphozyten zuordnen: Transitionale B-Lymphozyten ($CD19+CD27-CD24^{hi}CD38^{hi}$) und B10 ($CD19+CD27+CD24+$).

Transitionale B-Lymphozyten stellen eine Entwicklungsstufe der B-Lymphozyten dar (Sims, Ettinger et al. 2005). Es sind die ersten Zellen, die aus den Vorläufern der B-Lymphozyten hervorgehen, und aus dem Knochenmark in das periphere Blut ausgeschwemmt werden.

Seit wenigen Jahren erfahren transitionale B-Lymphozyten vermehrte Aufmerksamkeit, da gezeigt werden konnte, dass ein Großteil dieser Zellen immunregulatorische und -suppressive Wirkungen ausübt und Störungen dieser Zellen bei einigen Autoimmunerkrankungen beobachtet wurden (Blair, Norena et al. 2010, Flores-Borja, Bosma et al. 2013, Mauri und Menon 2015). Transitionale B-Lymphozyten unterdrücken bei Gesunden sowohl die Proliferation von $CD4+CD25-$ T-Lymphozyten als auch die Sekretion von $IFN-\gamma$ und Tumornekrosefaktor (TNF) (Flores-Borja, Bosma et al. 2013).

Es wurden verschiedene Mechanismen diskutiert, über die transitionale B-Lymphozyten ihre immunsuppressive Wirkung ausüben. Am weitesten akzeptiert ist die Ausschüttung von Interleukin 10 (IL-10) mit seinen regulatorischen Eigenschaften (Couper, Blount et al. 2008, Mauri 2010, Mauri und Menon 2015). Bei murinen transitionalen B-Lymphozyten

wird die Hauptwirkung der Zellen (nahezu) ausschließlich über IL-10 vermittelt. Beim Menschen stellt sich die Situation komplizierter dar. Obwohl auch hier die Sekretion von IL-10 ein wichtiger Bestandteil der Interaktion ist, können humane transitionale B-Lymphozyten weiterhin in vermindertem Maße immunsuppressive Wirkung ausüben, wenn IL-10 experimentell ausgeschaltet wird (Blair, Norena et al. 2010, Flores-Borja, Bosma et al. 2013). Unter den weiteren Mechanismen, derer sich transitionale B-Lymphozyten bedienen, werden die direkte Zell-Zell-Interaktion mit T-Lymphozyten über die co-stimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 angenommen, ebenso die Sekretion des antiproliferativen Transforming Growth Factor β (TGF- β) (Blair, Norena et al. 2010, Yang, Rui et al. 2013).

Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wurden Veränderungen dieser regulatorischen B-Lymphozyten festgestellt:

Bei Patienten mit SLE sind regulatorische B-Lymphozyten funktionell eingeschränkt, können z.B. nicht wie beim Gesunden die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch CD4⁺ T-Lymphozyten einschränken (Blair, Norena et al. 2010). *Flores-Borja et al.* konnten zeigen, dass transitionale B-Lymphozyten sowohl funktionell eingeschränkt als auch im peripheren Blut vermindert sind bei Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis im Vergleich zu Patienten mit in Remission befindlicher rheumatoider Arthritis oder gesunden Kontroll-Probanden (Flores-Borja, Bosma et al. 2013). Bei Nierentransplantierten konnte eine positive Korrelation zwischen erhöhten Konzentrationen von transitionalen B-Lymphozyten und einem verbesserten Organüberleben gezeigt werden (Newell, Asare et al. 2010).

Eine Depletion der B-Lymphozyten im Mausexperiment mittels eines monoklonalen Antikörpers zeigte anschließend eine prozentuale Überrepräsentation der murinen transitionalen B-Lymphozyten, was zu einer Verhinderung oder zumindest Verzögerung des Diabetes bei den NOD-Mäusen führte (Hu, Rodriguez-Pinto et al. 2007). *Hu et al.* stellten sowohl eine durch die transitionalen B-Lymphozyten verursachte Expansion von T_{reg} als auch eine IL-10-abhängige Immunsuppression fest. Weiterhin waren die Autoren der Meinung, dass die einmalige Behandlung mit Rituximab nicht so erfolgreich ist wie eine zyklisch wiederholte, da die transitionalen B-Lymphozyten als Entwicklungsstufe der

B-Lymphozyten nach einer B-Zell-Depletion früh expandieren und ihre regulatorischen Eigenschaften ausüben. Mit der Zeit differenzieren sie zu reifen B-Lymphozyten und verlieren dadurch ihre immunregulatorische Wirkung (Hu, Rodriguez-Pinto et al. 2007). Ein analoger Mechanismus ist auch beim Menschen und der nur zeitlich begrenzten Wirkung von Rituximab beim T1D (s.o.) denkbar (Pescovitz, Greenbaum et al. 2009, Mauri 2010).

Ein weiterer Phänotyp von regulatorischen B-Lymphozyten, mit der Expression von CD19+CD27+CD24+ (Iwata, Matsushita et al. 2011), vermittelt seine Wirkung ebenfalls über die Produktion von IL-10 und wird in Anlehnung an den analogen Zelltyp bei Mäusen auch als B10 bezeichnet. Im Gegensatz zu den o.g. Studien an transitionalen B-Lymphozyten zeigte sich eine Vermehrung dieser B10 und ihrer Progenitorzellen bei Patienten mit SLE und Sjögren-Syndrom (Iwata, Matsushita et al. 2011).

Der Phänotyp unterscheidet sich aber von den oben genannten transitionalen B-Lymphozyten durch die Expression von CD27, einem klassischen Marker von Gedächtnis-B-Lymphozyten (Agematsu, Hokibara et al. 2000). Ob es sich bei transitionalen B-Lymphozyten und B10 um zwei verschiedene Zelltypen, ähnliche oder sogar denselben in verschiedenen Entwicklungsstufen handelt, muss weitere Forschung auf dem Gebiet der regulatorischen B-Lymphozyten zeigen. Zur Differenzierung der beiden Arten werden B-Lymphozyten mit der Expression von CD19+CD27-CD24^{hi}CD38^{hi} in dieser Arbeit als transitionale B-Lymphozyten und B-Lymphozyten mit der Expression von CD19+CD27+CD24+ als B10 bezeichnet.

Um die Untersuchung des „Kompartiments“ der B-Lymphozyten zu vervollständigen und um vor allem Störungen in der Ausreifung bis zu den Plasmazellen detektieren zu können, wurden weitere Entwicklungsschritte der B-Lymphozyten untersucht. Beim SLE sind Ausreifungsstörungen der B-Lymphozyten mehrfach beschrieben (Arce, Jackson et al. 2001, Jacobi, Zhang et al. 2009, Dorner, Jacobi et al. 2011) und werden für das Auftreten von Autoantikörpern bereits Jahre vor der klinischen Manifestation verantwortlich gemacht (Thorarinsdottir, Camponeschi et al. 2015). Da Ähnliches für die Pathogenese des T1D zutrifft, bei dem Autoantikörper lange vor Diagnose auftreten können, auch ohne zum

Diabetes zu führen (In't Veld, Lievens et al. 2007), sollten in dieser Arbeit zusätzlich weitere Entwicklungsstufen von B-Lymphozyten untersucht werden.

Als zwei weitere Entwicklungsstufen der B-Lymphozyten-Differenzierung wurden IgM+IgD+ B-Lymphozyten und Plasmablasten gewählt. IgM+ IgD+ B-Lymphozyten sind reife B-Lymphozyten, die das Knochenmark verlassen haben, aber noch nicht mit Antigen konfrontiert waren (naiv) und den von T-Lymphozyten abhängigen Klassenwechsel zu einem anderen Immunglobulin-Molekül noch nicht vollzogen haben (Murphy, Travers et al. 2009). Plasmablasten sind Zellen, die wie Plasmazellen Antikörper freisetzen, aber sich noch teilen. Nach wenigen Tagen hören Plasmablasten auf, sich zu teilen. Sie sterben dann entweder ab oder differenzieren sich weiter zu Plasmazellen (Murphy, Travers et al. 2009). Sie exprimieren in großem Maße die Oberflächenantigene CD19+, CD27+ und CD38+ (Fink 2012). CD27 ist ein Marker von Memory-B-Lymphozyten und CD38 vermittelt Lymphozytenaktivierung und Adhäsion (Ferrero und Malavasi 1999). Die Expansion von Plasmablasten im peripheren Blut korreliert beim SLE mit der Krankheitsaktivität (Jacobi, Mei et al. 2010).

3.2.3 Aktivierte B-Lymphozyten

Die Involvierung von B-Lymphozyten in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes legt eine verstärkte Aktivierung derselben nahe. Dies konnte beim Systemischen Lupus Erythematodes, der sich wie der T1D durch die Produktion von Autoantikörpern auszeichnet (Mohan, Morel et al. 1997), beobachtet werden. Dort ist eine abnormale Aktivierung der B-Lymphozyten mehrfach vorbeschrieben (Odendahl, Jacobi et al. 2000, Arce, Jackson et al. 2001, Bijl, Horst et al. 2001, Wehr, Eibel et al. 2004), insbesondere einer Population von B-Lymphozyten mit der niedrigen Expression von CD21 (CD21low) (= Komplement-Rezeptor 2 (Szakonyi, Guthridge et al. 2001)). CD19 und CD21 formen zusammen mit CD81 einen Co-Stimulationskomplex für B-Lymphozyten und modulieren so die Signalkaskade des B-Zell-Rezeptors (Tedder, Zhou et al. 1994).

Diese CD21low-Population zeigte sich beim SLE expandiert, unabhängig von der Krankheitsaktivität (Wehr, Eibel et al. 2004). Auch bei anderen systemischen Autoimmunerkrankungen wie beim primären Sjögren-Syndrom oder der Granulomatose mit Polyangiitis finden sich CD21low B-Lymphozyten im Vergleich zu gesunden

Kontrollen vermehrt im peripheren Blut (Wehr, Eibel et al. 2004), ebenso bei Patienten mit variablem Immundefektsyndrom mit zusätzlichen Autoimmunphänomenen (Warnatz, Denz et al. 2002), wo sie auch mit der Anzahl an autoreaktiven B-Lymphozyten korreliert (Rakhmanov, Keller et al. 2009).

Der aktivierte Phänotyp von CD21^{low} B-Lymphozyten spiegelt sich wider in einer Größenzunahme gegenüber normalen B-Lymphozyten (Rakhmanov, Keller et al. 2009) und der vermehrten Expression von IgD, des FAS-Rezeptors CD95 und des co-stimulatorischen Moleküls CD86 (Wehr, Eibel et al. 2004), was die Interaktion mit T-Lymphozyten ermöglicht (Hathcock und Hodes 1996). CD95 löst bei Interaktion mit FAS-Ligand (CD178) die Apoptose der CD95 tragenden Zelle aus. CD95 wird besonders stark von aktivierten Lymphozyten exprimiert, um überschießende Immunantworten einzudämmen (Nagata und Golstein 1995). Es kann somit als Marker für aktivierte Lymphozyten genutzt werden. Der FAS-Ligand wird vor allem von zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert (Nagata und Golstein 1995, Krammer 2000). Das co-stimulatorische CD86 ist beim SLE vermehrt auf CD19⁺ B-Lymphozyten exprimiert und korreliert mit der Krankheitsaktivität, der Aktivierung von B-Lymphozyten und dem Titer der Anti-Doppelstrang-DNS-Antikörper (Bijl, Horst et al. 2001).

3.3 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen sind Bestandteil der angeborenen Immunantwort und verfügen über die gleichen Mechanismen zum Abtöten anderer Zellen wie zytotoxische T-Lymphozyten (Kos, Perišić Nanut et al. 2014). Dazu gehören u.a. die FAS und FAS-Ligand Interaktion zur Auslösung der Apoptose (Russell und Ley 2002) und die Sekretion von zytotoxischen Granula mit Perforinen und Granzymen (Burkhardt, Hester et al. 1990).

Allerdings erfolgt bei ihnen keine Selektion für ein spezifisches Antigen und Aktivierung wie bei der adaptiven Immunantwort z.B. durch T-Lymphozyten (Kos und Engleman 1996), sondern NK-Zellen verfügen über ein konstantes Repertoire an Rezeptoren, die Merkmale von infizierten, überalterten oder malignen Zellen erkennen und zur Vernichtung der erkannten Zelle durch NK-Zellen führen. NK-Zellen haben somit die Fähigkeit, ohne vorherige Antigenpräsentation Zellen abzutöten (Karre 2002).

Die Steuerung der Zytotoxizität der NK-Zelle wird vermittelt über auf ihrer Oberfläche exprimierte aktivierende und inhibitorische Rezeptoren, die an Strukturen anderer Zellen binden. Durch intrazelluläre Signalkaskaden werden die Signale „verrechnet“ und je nachdem, welche Wirkung überwiegt, wird die erkannte Zelle attackiert oder nicht (Vivier, Nunes et al. 2004).

Ein typischer Mechanismus, den die NK-Zellen dazu nutzen, ist die Überprüfung der Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle. Maligne Zellen, die MHC-I herunterreguliert haben, um der T-Zell-vermittelten Immunantwort zu entgehen, werden so im Idealfall durch NK-Zellen abgetötet (Karre, Ljunggren et al. 1986).

3.3.1 Physiologie und Unterteilung der Natürlichen Killerzellen

Eine klassische Unterteilung von NK-Zellen im peripheren Blut erfolgt über die Expression von CD56 in zwei Populationen (s. Abb.1): CD56^{low} und CD56^{high}, die sich funktionell unterscheiden. Die CD56^{high}-Population stellt etwa 10% der NK-Zellen dar, sezerniert große Mengen an Zytokinen wie IFN- γ und proliferiert nach Stimulation (Cooper, Fehniger et al. 2001), zeigt aber geringe zytotoxische Eigenschaften. Im Gegensatz dazu weist die

größere Gruppe der CD56low (ca. 90% der NK-Zellen) ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften, jedoch kaum Proliferationsfähigkeit und Zytokinproduktion auf.

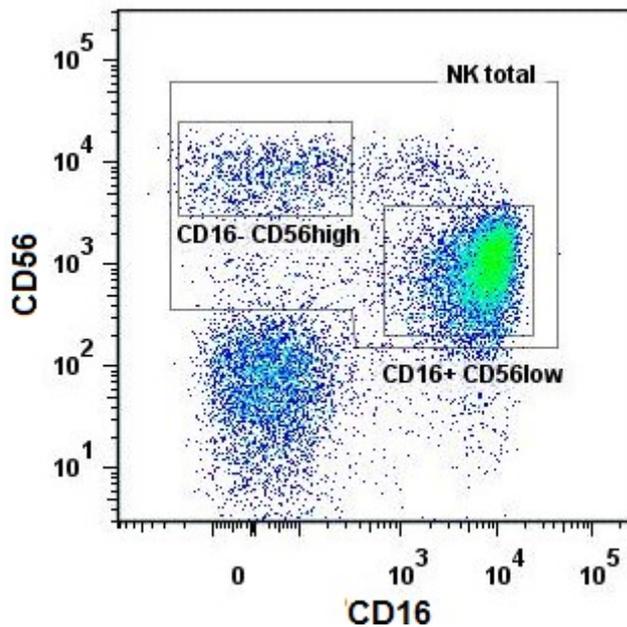


Abbildung 1: Untergruppen von NK-Zellen definiert über die Expression von CD16 und CD56.

Auswahl der Populationen CD16-CD56high, CD16+CD56low und gesamte NK-Zellen (NK total). Repräsentatives Beispiel von einem Probanden ohne T1D.

Es gibt eine gute Evidenzlage dafür, dass eine Differenzierung von der CD56high-Gruppe hin zur CD56low-Gruppe erfolgt. Diese Ansicht wird dadurch untermauert, dass Zellen der CD56high-Gruppe längere Telomere aufweisen (Romagnani, Juelke et al. 2007) und in den sekundären lymphatischen Organen im Gegensatz zum peripheren Blut den vorherrschenden Typ von NK-Zellen darstellen (Chan, Hong et al. 2007, Romagnani, Juelke et al. 2007).

3.3.2 Natürliche Killerzellen und der Typ-1-Diabetes

NK-Zellen können mit Antikörpern opsonierte Zellen töten, indem sie an die Fc-Fragmente dieser Antikörper über den NK-Rezeptor CD16 binden und ihre zytotoxischen Granula freisetzen (Perussia 1998). Dies wird als Antikörper-abhängige zelluläre Immunität bezeichnet. In Anbetracht der Autoantikörper gegen Inselzellantigene beim T1D scheint eine Beteiligung von NK-Zellen somit möglich.

Von NK-Zellen produziertes IFN- γ kann direkt bei Betazellen die Apoptose auslösen und indirekt die Autoimmunreaktion verstärken, indem es die MHC-I-Expression auf Betazellen verstärkt (Eizirik, Colli et al. 2009, Lehuen, Diana et al. 2010).

Neben diesen theoretischen Überlegungen konnte eine Beteiligung von NK-Zellen an der Pathogenese des T1D an verschiedenen Tiermodellen und auch beim Menschen gezeigt werden:

Der aktivierende NKp46-Rezeptor (CD335) auf NK-Zellen stellt einen der Hauptrezeptoren auf NK-Zellen dar und kann einen bisher nicht näher identifizierten Liganden auf Betazellen im Modell der NOD-Maus und auch beim Menschen binden (Gur, Enk et al. 2011). Bei der NOD-Maus kann die gleichzeitige Blockade von NKp46 und des Rezeptors NKG2D den Diabetes verhindern (Gur, Porgador et al. 2010).

Enteroviren wie Coxsackie B4 zählen zu den lange diskutierten Risikofaktoren für die Entwicklung von T1D. Es konnten in den Betazellen von Typ-1-Diabetikern Coxsackie-B4-Viren nachgewiesen werden, begleitet von einer Infiltration von NK-Zellen, die führend an der Insulitis beteiligt waren (Dotta, Censini et al. 2007).

Bei einem Mausmodell ohne funktionierende FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen waren NK-Zellen die frühesten das Pankreas infiltrierenden Zellen, die mittels IFN- γ -Ausschüttung die CD4⁺ T-Lymphozyten zum Angriff auf Betazellen führten (Feurerer, Shen et al. 2009).

3.3.3 Oberflächenrezeptoren der Natürlichen Killerzellen und ihre Eigenschaften

Entsprechend ihres physiologischen Aktivierungsmechanismus (s.o.) wurde in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung der Natürlichen Killerzellen der Ansatz gewählt, die Expression von aktivierenden und inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren zu untersuchen, um Rückschlüsse auf den Aktivierungsstatus zum Zeitpunkt der Pathogenese zu ziehen. Im Folgenden werden die untersuchten Rezeptoren vorgestellt.

3.3.3.1 Aktivierende Rezeptoren auf Natürlichen Killerzellen

CD62L ist ein Selektin, das auf Lymphozyten exprimiert wird, die Adhäsion am Endothel vermittelt und so die Emigration in entzündete Gewebe vorbereitet. Die Expression erfolgt konstitutiv auf Lymphozyten und wird im Rahmen von Entzündungen hochreguliert. Auf NK-Zellen wird es vor allem auf der CD56^{high}-Untergruppe exprimiert (Juelke, Killig et al. 2010).

CD69 ist ein Aktivierungsmarker, der auf NK-Zellen und verschiedenen Lymphozyten exprimiert wird. Im Modell der NOD-Maus zeigen die im Pankreas nachweisbaren eingewanderten NK-Zellen eine höhere Expression dieses Aktivierungsmarkers CD69 (Brauner, Elemans et al. 2010). Das für CD69 kodierende Gen wurde neben der allgemeinen Beschreibung als aktivierender Rezeptor auch durch *genome-wide association studies* am Menschen als verändertes Kandidatengen bei Typ-1-Diabetikern beschrieben (Barrett, Clayton et al. 2009).

NKG2D wird auf NK-Zellen und auf T-Lymphozyten exprimiert (Karre 2002, Ogasawara, Hamerman et al. 2003). Es bindet an eine Gruppe von Molekülen, die als Reaktion auf metabolischen Stress oder Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien, produziert werden: MIC-A und MIC-B. Die Bindung des Liganden löst eine Aktivierung der NK-Zellen aus. In der NOD-Maus weist dieser Rezeptor eine funktionelle Einschränkung auf, verursacht durch die Herunterregulation des Rezeptors nach Aktivierung (Ogasawara, Hamerman et al. 2003).

CD117 (c-Kit) ist eine Rezeptortyrosinkinase, die u.a. Stammzellsfaktor bindet und bei Aktivierung Proliferationssignale an die Zelle weiterleitet. C-Kit wirkt anti-apoptotisch auf die es exprimierenden NK-Zellen mittels der Expression des Regulatorproteins *B-cell lymphoma 2* (*bcl-2*) (Carson, Haldar et al. 1994).

CD122 ist ein transmembranäres Glykoprotein und bildet die β -Kette der beiden IL-2 und IL-15 Rezeptoren auf NK-Zellen. Es wird konstitutiv auf NK-Zellen exprimiert und ist auf NK-Zell-Progenitorzellen hochreguliert (Luetke-Eversloh, Killig et al. 2013). Der IL-2R vermittelt die Proliferationsignale an die NK-Zelle und gilt als Aktivierungsmarker (Minami, Kono et al. 1993).

CD197 (Chemokine Receptor 7, CCR7) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der von Lymphozyten und NK-Zellen genutzt wird, um in sekundäre lymphatische Gewebe einzuwandern. Er wird vornehmlich von der CD56high Untergruppe gebildet (Pradier, Tabone-Eglinger et al. 2014).

3.3.3.2 Inhibitorische Rezeptoren auf Natürlichen Killerzellen

CD94/NKG2A sind zwei C-Typ-Lektine, die ein Heterodimer bilden, das mit nicht-polymorphen MHC-Klasse-I-Molekülen interagiert, wie z.B. HLA-E (Murphy, Travers et al. 2009). Dieses Heterodimer übt eine inhibitorische Wirkung auf NK-Zellen aus, so wird etwa die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF durch CD94/NKG2A gedrosselt (de Matos, Berg et al. 2007).

CD161 beeinflusst die Zytotoxizität von NK-Zellen. Es gibt jedoch widersprüchliche Berichte über entweder eine inhibitorische (Aldemir, Prod'homme et al. 2005, Rosen, Bettadapura et al. 2005) oder aktivierende (Konjevic, Mirjadic Martinovic et al. 2009) Funktion dieses Oberflächenmoleküls. Darüber hinaus ist die Signalkaskade, die seine Wirkung vermittelt, nicht bekannt.

Die Untersuchung der Expression der Rezeptoren wurde bei allen Rezeptoren, bei denen eine gleichmäßige Verteilung auf die beiden CD56high und CD56low Hauptgruppen zu erwarten war, in der CD56low-Gruppe untersucht, da diese mit einem Anteil von etwa 90% (Solana, Campos et al. 2014) die größere Zellausbeute und damit die aussagekräftigeren Ergebnisse erwarten ließ.

Ausnahme hiervon war die Untersuchung der Expression von CD62L und CD197, die ausschließlich auf CD56high NK-Zellen in großem Ausmaß exprimiert werden (Ferlazzo, Thomas et al. 2004, Pradier, Tabone-Eglinger et al. 2014).

3.4 Monozyten

Monozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die im Blut zirkulieren und in periphere Gewebe emigrieren, wo sie unter gewissen Voraussetzungen zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen differenzieren können (Italiani und Boraschi 2014, Jenkins und Hume 2014). Sie fungieren als phagozytierende und Antigen-präsentierende Zellen (Ziegler-Heitbrock 2007). Außerdem können sie über die Ausschüttung von Interleukinen Zellen des adaptiven Immunsystems anlocken (Danis, Millington et al. 1995).

Monozyten exprimieren als Teil des angeborenen Immunsystems den Fc-Rezeptor CD16 und zusätzlich den Rezeptor CD14, der der Erkennung von Lipopolysacchariden, einem Hüllbestandteil gramnegativer Bakterien, dient. Anhand der Expression dieser beiden Moleküle auf der Zelloberfläche der Monozyten können Untergruppen gebildet werden, die verschiedenen Aufgaben wahrnehmen (Passlick, Flieger et al. 1989, Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al. 2010). CD14^{high}CD16⁺, CD14^{low}CD16⁺, CD14^{high}CD16⁻ sind die üblicherweise unterschiedenen Untergruppen. Die relative Verteilung der Monozyten auf diese Gruppen kann bei verschiedenen Krankheiten gestört sein (Rogacev, Seiler et al. 2011, Ziegler-Heitbrock 2014).

3.4.1 Monozyten-Untergruppen und ihre Veränderungen beim Typ-1-Diabetes

Irvine et al. erweiterten die Verteilung der mittels CD14 und CD16 gebildeten Varianten von Monozyten um die Gruppe der CD14^{low}CD16⁻ Monozyten (Irvine, Gallego et al. 2012). So wurden vier Gruppen von Monozyten gebildet: CD14^{high}CD16⁺, CD14^{low}CD16⁺, CD14^{high}CD16⁻, CD14^{low}CD16⁻. Es konnte von *Irvine et al.* gezeigt werden, dass sowohl bei frisch diagnostizierten als auch bei Diabetikern mit längerem Krankheitsverlauf die Verteilung der Monozyten-Untergruppen verändert war. Die Gruppe der CD14^{high}CD16⁺ Monozyten war bei den Typ-1-Diabetikern im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert, wohingegen die CD14^{low}CD16⁻ Monozyten vermehrt waren.

Gleichgerichtete Veränderungen dieser beiden Untergruppen von Monozyten ließen sich auch im Vergleich von gesunden Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern mit gesunden Kontrollpersonen finden. Dies lässt die Annahme zu, dass die Veränderungen

keine Folge der schlechteren glykämischen Kontrolle, sondern vorbestehend und eventuell pathogenetisch bedeutsam sind (Irvine, Gallego et al. 2012).

Diese bisher nur von *Irvine et al.* publizierten Veränderungen der Monozyten-Untergruppen sollten mit dieser Arbeit an den beiden Studienpopulation DiMelli und TEENDIAB überprüft werden.

3.4.2 Expression von Siglec-1 auf Monozyten

Eine Assoziation zwischen T1D und viralen (Atemwegs-)Infekten in der Kindheit wird seit Langem vermutet und diskutiert, und konnte auch anhand einer Kohortenstudie gezeigt werden (Beyerlein, Wehweck et al. 2013). Im Mausmodell sowie beim Menschen kann außerdem durch genomweite Assoziationsstudien eine antivirale IFN-Antwort mit einem erhöhten T1D-Risiko assoziiert werden (Ferreira, Guo et al. 2014).

Eine multinationale Studie untersuchte die Expression von IFN-induzierbaren Genen bei Personen mit T1D, gesunden Kontrollen und Kindern mit einem genetischen Risiko für die Entwicklung von T1D. Es konnte eine signifikant vermehrte Expression dieser IFN-induzierbaren Genen bei Kindern mit genetischem Risiko vor der Serokonversion zu Autoantikörpern gezeigt werden. Bei Kindern mit genetischem Risiko, bei denen aber keine Serokonversion stattfand, war die Expression dieser IFN-Signatur deutlich weniger ausgeprägt. Die Expression dieser IFN-induzierbaren Gene stellt somit einen Risikofaktor für die Entwicklung der Autoimmunreaktion bei Kindern mit einer genetischen Prädisposition zum T1D dar, der noch vor dem Auftreten von Autoantikörpern nachweisbar ist (Ferreira, Guo et al. 2014).

Die gefundene IFN-Signatur induziert die vermehrte Expression von 225 Genen, darunter auch solche, die für Oberflächenproteine auf Immunzellen kodieren. *Ferreira et al.* bestimmten unter diesen Oberflächenproteinen Siglec-1 (CD169) auf CD14⁺ Monozyten als das einzige zuverlässig durch IFN-Stimulation *in vitro* hochregulierte. Auch bei Testpersonen mit aktiver IFN-Signatur konnte mittels Durchflusszytometrie die vermehrte Expression von Siglec-1 auf CD14⁺ Monozyten im peripheren Blut nachgewiesen werden (Ferreira, Guo et al. 2014). Siglec-1 stellt somit einen geeigneten Indikator für eine aktive IFN-Signatur *in vivo* und *in vitro* dar.

Die IFN-Signatur war nur für einen kurzen Zeitraum nachweisbar: nach einer Influenza-Impfung konnte im Mittel drei Tage gerade noch ein erhöhter IFN-Spiegel im peripheren Blut gemessen werden, bei viralen Atemwegsinfekten und Patienten mit aktivem SLE für einen noch längeren Zeitraum.

Anknüpfend an jene Ergebnisse sollte in dieser Arbeit die Expression von Siglec-1 auf CD14⁺ Monozyten an einem weiteren Kollektiv per Durchflusszytometrie untersucht werden. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob Siglec-1 auch kurz nach klinischer Manifestation des T1D noch vermehrt exprimiert wird.

3.5 Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen (Myeloid-derived Suppressor Cells, MDSC) stellen eine heterogene Gruppe von Zellen dar (Bronte, Brandau et al. 2016), die sich in geringem Umfang im peripheren Blut von Gesunden finden und physiologischerweise eine hemmende Wirkung auf das Immunsystem haben (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Ihnen ist die Entwicklung aus unreifen Vorläuferzellen der myeloischen Reihe gemeinsam und ihre immunsuppressive Funktion mittels einer Unterdrückung von vornehmlich T-Lymphozyten (Rodriguez, Hernandez et al. 2005). Die MDSC können dabei sowohl Antigen-spezifisch als auch unspezifisch die Immunantwort von T-Lymphozyten unterdrücken (Yin, Ma et al. 2010). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung von T-Lymphozyten durch MDSC eine direkte Zell-Zell-Interaktion voraussetzt. Die vorgeschlagenen Konzepte für die molekulare Wirkung beinhalten eine Hemmung der Expression von CD3 auf T-Lymphozyten (Rodriguez, Zea et al. 2002) und verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Weiterhin kann über Reaktive Sauerstoffspezies direkt eine Apoptose in T-Lymphozyten ausgelöst werden (Kusmartsev, Nefedova et al. 2004). Neben dem Ausschalten von Effektor-T-Zellen wurde auch die Expansion von regulatorischen T-Lymphozyten durch MDSC beschrieben (Huang, Pan et al. 2006, Yin, Ma et al. 2010). Ebenfalls wurde eine suppressive Wirkung auf Makrophagen gezeigt (Sinha, Clements et al. 2007).

Die MDSC umfassen, charakterisiert durch ihren Phänotyp, Vorläufer von Makrophagen, Dendritischen Zellen und Granulozyten, exprimieren aber nicht deren Oberflächenmarker. Die beiden am besten beschriebenen Untergruppen von MDSC sind die granulozytischen MDSC und die monozytischen MDSC (Movahedi, Williams et al. 2008, Youn, Nagaraj et al. 2008). Diese Phänotypen können, durch die Wirkung von Stimulationsfaktoren und durch die Gewebe, in die sie einwandern, ineinander übergehen (Gabrilovich und Nagaraj 2009).

3.5.1 Myeloide Suppressorzellen bei Autoimmunerkrankungen

In der Literatur finden sich MDSC vor allem im Zusammenhang mit dem *Tumorenviroment* bei der Entwicklung maligner Tumore und ihrer hier schädlichen Hemmung auf die körpereigene Tumorbekämpfung (Terabe, Matsui et al. 2003, Huang,

Pan et al. 2006), u.a. als verantwortlich für die abgeschwächte T-Zell-Antwort bei Krebspatienten (Sinha, Clements et al. 2007, Gabrilovich und Nagaraj 2009). Es konnte jedoch auch eine Expansion dieser Zellen bei Entzündungen (Smith und Reynolds 2014) und Infektionen (Goni, Alcaide et al. 2002, Voisin, Buzoni-Gatel et al. 2004, Ost, Singh et al. 2016) als auch bei Autoimmunerkrankungen (Crook und Liu 2014) nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der MDSC wurde hier im Speziellen verfolgt basierend auf einer Arbeit von *Ioannou et al.*, die die Rolle von MDSC im Modell der Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-Maus und bei an Multipler Sklerose (MS) erkrankten Patienten untersuchte (Ioannou, Alissafi et al. 2012). Hier konnte gezeigt werden, dass die Untergruppe der granulozytischen Myeloiden Suppressorzellen, G-MDSC, bei der schubförmig-remittierenden Form der Multiplen Sklerose kurz vor der Remission massenhaft expandierte und zur Auflösung der Entzündung beitrug. Die G-MDSC konnten dabei die Aktivierung und Expansion von T-Lymphozyten *in vitro* unterdrücken. Es fand sich die höchste Konzentration von G-MDSC im peripheren Blut zur Zeit des Schubs der MS. Mit der Remission der Symptome fand eine Regression dieser Population statt.

Der dort beschriebene Typ der G-MDSC exprimiert den gemeinsamen Marker der myeloischen Reihe, CD33, aber noch keine Marker von reifen Zellen wie CD14 oder das MHC-II-Molekül HLA-DR. Weiterhin wurde die Expression des Granulozytenmarkers CD15 auf der Oberfläche von Granulozytischen MDSC beschrieben. Die untersuchte Subpopulation der G-MDSC wurde daher als HLA-DR^{-/low}CD14⁻CD33⁺CD15⁺ definiert.

Die gezeigte Suppression von T-Lymphozyten machte die Untersuchung der G-MDSC beim T1D interessant, der als durch T-Lymphozyten verursachte Erkrankung betrachtet wird. Murine MDSC (11b⁺Gr-1⁺) sind zudem in der Lage, im Mausmodell den T1D zu verhindern. *Yin, Ma et al.* infundierten nicht diabetische NOD/SCID-Mäuse (ohne eigene funktionelle B- oder T-Lymphozyten) mit autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen von diabetischen NOD-Mäusen. Ohne Intervention entwickelte sich ein autoimmuner Diabetes bei allen NOD/SCID-Mäusen. Intravenös gegebene MDSC verminderten die Wahrscheinlichkeit

des Auftretens eines autoimmunen Diabetes signifikant, ebenso wie die Insulinitis. 60% der mit G-MDSC behandelten Mäuse blieben diabetesfrei (Yin, Ma et al. 2010).

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich Veränderungen der G-MDSC (HLA-DR⁻/lowCD14⁻CD33⁺CD15⁺) bei Kindern mit T1D beobachten lassen. Besonders bei der in Diskussion stehenden potentiellen phasenhaften Entwicklung des T1D (Bonifacio, Scirpoli et al. 1999, von Herrath, Sanda et al. 2007) könnte eine ähnliche Expansion wie bei der MS zu beobachten sein.

4 Material und Methoden

Diese Arbeit nutzte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), die im Rahmen der beiden Kohortenstudien DiMelli und TEENDIAB des Instituts für Diabetesforschung, unter Leitung von Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler, Helmholtz Zentrum München, gewonnen wurden. Aus DiMelli wurden Kinder mit neu manifestiertem T1D ausgewählt, aus TEENDIAB gesunde Kinder mit T1D in der Familienanamnese. Im Folgenden werden die Studien mit ihren Charakteristika und erhobenen Daten vorgestellt, die zum Teil in dieser Arbeit verwendet wurden - wie HbA1c, C-Peptid-Ausschüttung und Autoantikörper-Titer.

4.1 Die Kohortenstudie DiMelli

Bei der DiMelli-Studie handelt es sich um eine Kohortenstudie, die Kinder und Jugendliche erfasst, bei denen kürzlich jedwede Art von Diabetes Mellitus festgestellt wurde. Die Diagnose Diabetes wurde anhand der Kriterien der American Diabetes Association / World Health Organization gestellt.

Die Kohorte umfasst Kinder und junge Erwachsene, die zum Zeitpunkt der Erstmanifestation des Diabetes mellitus jünger als 20 Jahre waren, und innerhalb von sechs Monaten nach Diagnose für die Studie registriert wurden. Es handelt sich ausschließlich um Personen aus Bayern, die über Ärzte in Kinderkliniken oder über Hausärzte mit Spezialisierung auf Diabetologie rekrutiert wurden.

Die Studie soll Tendenzen in der Inzidenz und Änderungen des Phänotyps von Typ-1 und Typ-2-Diabetes untersuchen und außerdem überlappende oder gemischte Typ-1/2-Syndrome identifizieren.

Informationen über die klinische Manifestation und Demographie wurden über einen standardisierten Fragebogen durch die rekrutierenden Ärzte festgestellt. Der Fragebogen beinhaltet:

- Diagnose des Diabetes
- Dauer der Symptome

- Gewichtsverlust vor der Diagnose
- Ketoazidose
- Zurzeit eingenommene Medikamente
- Vorbekannte Autoimmunkrankheiten, die mit Diabetes assoziiert sind
- Demographische Faktoren (Staatsangehörigkeit der Eltern, Bildungsstand)

Größe, Gewicht, Taillen-, Hüftumfang, Blutdruck, Nüchternblutzucker und Tanner-Stadien wurden in der Klinik bestimmt.

Eine venöse Blutprobe wurde von den rekrutierenden Ärzten abgenommen und im Labor des Instituts für Diabetesforschung auf die folgenden Parameter analysiert:

- Autoantikörper gegen Insulin (IAA), Glutaminsäure-Decarboxylase (GADA), Insulinom-assoziiertes Protein 2 (IA-2A) und Zink-Transporter 8 (ZnT8A)
- Autoantikörper gegen Gewebetransglutaminase C (TGCA) und gegen Thyreoperoxidase (TPOA)
- Nüchternkonzentration von C-Peptid und Insulin
- Glykiertes Hämoglobin A1c (HbA1c)
- Triglyceride, Gesamtcholesterin, HDL, LDL
- Genotypisierung für HLA-DR/DQ, INS VNTR, MODY, sowie für single-nucleotide polymorphisms (SNP), die mit Typ-1 und Typ-2-Diabetes assoziiert sind.

Die Studie wurde genehmigt durch die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer (#08043). (Thumer, Adler et al. 2010)

4.2 Die Kohortenstudie TEENDIAB

Die TEENDIAB-Studie untersucht den Zeitraum von Pubertät und jungem Erwachsenenalter in der natürlichen Entwicklung des T1D. Es handelt sich um eine prospektive Kohortenstudie, die Kinder mit T1D in der Familienanamnese von der Pubertät bis zum Alter von 18 Jahren beobachtet. Die Kinder können in die Studie eingeschlossen werden, wenn sie älter als 6 und jünger als 12 Jahre sind, in Deutschland leben und zumindest einen Elternteil oder Geschwisterkind mit T1D haben.

Die Kinder werden nicht in die Studie eingeschlossen, wenn sie an einer Krankheit leiden, die einen Langzeit-Follow-Up unmöglich macht oder die eine Medikation benötigt, die die natürliche Entwicklung des T1D verändern könnte.

Folgende Daten wurden erhoben:

- Demographische und sozioökonomische Daten
- IAA, GADA, IA-2A und ZnT8A
- Autoantikörper gegen Transglutaminase und Thyreoperoxidase als Marker von anderen Autoimmunerkrankungen, deren Vorkommen in dieser Kohorte erwartet wird
- Genotypisierung für HLA DR/DQ, INS VNTR und die T1D- und T2D-assoziierten Genotypen PTPN22, ERBB3, PTPN2, KIAA0350, CD25, IFIH1, IL2, IL7R, TCF7L2, KCNJ11, PPARG, IGF2BP2, CDKAL1, SLC30A8, HHEX-IDE, FTO und CDKN2A-2B
- Hämoglobin A1c und Nüchternblutglukosekonzentration
- Intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT) und oraler Glukosetoleranztest (OGTT), um die Insulinsensitivität und Betazell-Funktion zu bestimmen
- Gewicht, Größe, Taillen- und Hüftumfang und Messung der Hautfaltendicke an Triceps und subscapulärer Haut als Maß für Wachstum und Übergewicht
- Tannerstadien für Pubertät und Entwicklung
- Hormone: Testosteron, Estradiol, Dehydroepiandrosteronesulfat, Luteinisierendes Hormon, Follikelstimulierendes Hormon, freies Triiodthyronin, freies Thyronin, Thyroidea-stimulierendes Hormon, Growth Hormone, Insulin-like Growth factor, Cortisol, Parathormon für die Schätzung des Pubertätswachstums und der Funktion des endokrinen Systems.
- Blutdruck und Intima-Media-Dicke als Maß für eine frühe hypertensive Erkrankung
- Triglyceride, HDL, LDL, Adiponectin, Leptin, C-reaktives Protein und Interleukin 6
- PBMC
- Einschätzung der körperlichen Aktivität (über Fragebogen und Schrittzähler)
- Evaluierung der Ernährung

Die ausgewählten Kinder werden alle sechs Monate bis zum Alter von 14 Jahren untersucht und danach jährlich bis zum Alter von 18 Jahren. Dabei werden je nach Zeitpunkt verschiedene der oben genannten Parameter ermittelt.

Die Studie wurde genehmigt durch die Ethikkommissionen der Medizinischen Hochschule Hannover und der Technischen Universität München (#2149/08). (Ziegler, Meier-Stiegen et al. 2012)

4.3 Auswahlkriterien für Proben aus den beiden Kohortenstudien

DiMelli und TEENDIAB

In beiden Kohortenstudien wurden PBMC gewonnen, die in Kältetanks mit Flüssigstickstoff (Isothermal Series, Custom Biogenetics; Van Dyke, MI, USA) bei ca. -180°C gelagert wurden. Die Isolierung dieser PBMC aus dem Vollblut der Probanden für die beiden Studien DiMelli und TEENDIAB war nicht Bestandteil dieser Arbeit, sondern eine der Routinetätigkeiten im Labor des Instituts für Diabetesforschung. Aus diesen vorhandenen PBMC wurden Proben für diese Arbeit ausgewählt.

Die Zusammensetzung der PBMC von Menschen unterliegt einer physiologischen Variabilität, die vor allem von Alter, Geschlecht und Immunstatus abhängig ist (Dunn-Walters und Ademokun 2010, Solana, Campos et al. 2014). Um diese Variabilität zu berücksichtigen und eine Vergleichbarkeit der beiden Gruppen zu gewährleisten, wurde jeder DiMelli-Probe eine Probe aus TEENDIAB zugewiesen, die von einem Probanden gleichen Geschlechts und annähernd gleichen Alters (mit einer maximalen Altersdifferenz von 6 Monaten) stammte. Basierend auf diesen Maßgaben wurden Proben von Kindern im Alter von ca. 8 bis 15 Jahren ausgewählt. Die Aufnahme der hier untersuchten Probanden in die Kohortenstudien DiMelli und TEENDIAB erfolgte zwischen April 2010 und September 2013. Proben von Probanden, die zum Entnahmezeitpunkt an einer Infektion erkrankt waren, wurden ausgeschlossen. Nicht alle ausgewählten Proben konnten verwendet werden, aufgrund mangelnder Qualität (z.B. sehr hoher Anteil an apoptotischen Zellen, zu wenige Zellen für die Färbungen). So flossen 42 Probanden aus DiMelli und 49 Probanden aus TEENDIAB in die Untersuchung ein.

Die Vergleichbarkeit dieser Probanden bezüglich mittlerem Alter und Geschlechterverteilung wurde mittels t-Test und Chi²-Test überprüft. Die Charakteristika der Probanden sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

| Studiengruppe | Anzahl | Alter, mittleres Alter±SD | Geschlechterverhältnis | Anzahl Auto-Antikörper | | | Zeit seit Erstdiagnose T1D |
|---------------|--------|----------------------------------|------------------------|------------------------|----|----|----------------------------|
| | | | | ≥2 | ≥3 | =4 | |
| DiMelli | 42 | 8,0-14,8 Jahre, 11,2 ± 1,8 Jahre | 14w, 28m | 42 | 29 | 17 | 10 Tage Median |
| TEENDIAB | 49 | 8,1-14,8 Jahre 11,2 ± 1,9 Jahre | 22w, 27m | n.a. | | | n.a. |

Tabelle 2: Charakteristika der Probanden. Die Probanden der beiden Studiengruppen, mit Altersspanne und Geschlecht. Die Anzahl der Autoantikörper bezieht sich auf die Anzahl der beim Probanden nachgewiesenen T1D-typischen Autoantikörper gegen Insulin, Tyrosinphosphatase, Glutamatdecarboxylase 65 und Zinktransporter 8. w = weiblich, m = männlich, n.a. = nicht anwendbar, SD = Standardabweichung. Alter gerundet auf eine Nachkommastelle. Es gibt keine signifikante Evidenz für einen Unterschied im Alter (t-Test, p = 0,999) und der Geschlechterverteilung (Chi²-Test, p = 0,261) zwischen den verglichenen Probanden aus DiMelli und TEENDIAB.

4.4 Auftauen der Studienzellen

Die PBMC aus den Studien DiMelli und TEENDIAB wurden in einem Wasserbad bei Körpertemperatur (37°C) aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend in 37°C warmen DMEM-Medium mit Benzonase-Endonuclease (Merck KGaA, Darmstadt) in einer Konzentration von 25U/ml Medium resuspendiert, um intakte Zellen möglichst zahlreich am Leben zu erhalten und durch die enzymatische Degradation von freier DNA und RNA der Verklumpung der Zellen entgegenzuwirken.

Die Suspension wurde zentrifugiert (300g, 10 min, Raumtemperatur), der Überstand verworfen und das Zellpellet in FACS-Puffer (sterile phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) bei pH 7,2 mit 0,5 Massenprozent fötalem Kälberserum) resuspendiert. Ein kleiner Teil der Zellsuspension wurde einer Viabilitätsfärbung mit Tryptan-Blau unterzogen und mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt oder mit MUSE staining solution gefärbt und mittels des MUSE cell analyzer (beides von EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) gezählt.

So konnte die absolute Anzahl lebender Zellen aus den aufgetauten Proben relativ genau geschätzt und geplant werden, wie viele Zellen für die anschließenden Antikörper-Färbungen zur Verfügung standen.

4.5 Antikörper-vermittelte Färbung der untersuchten Immunzellen für die Durchflusszytometrie

Die im vorherigen Schritt gewonnene Zellsuspension wurde nun pro Probe auf bis zu acht verschiedene Wells auf einer 96-Well-Platte verteilt, entsprechend der maximal acht verschiedenen Antikörper-Färbungen pro Probe.

Es wurden untere Grenzen für die Anzahl an lebenden Zellen gesetzt, damit die entsprechende Färbung und anschließende Analyse noch sinnvoll durchzuführen war: Für die Färbungen der B-Lymphozyten 200.000 Zellen, für die Färbung der Natürlichen Killerzellen 300.000 Zellen, für die Färbung von Monozyten und MDSC 500.000 Zellen. Wenn nicht genug Zellen eines Probanden vorhanden waren, um alle Färbungen

durchzuführen, wurden Prioritäten gesetzt: B-Lymphozyten hatten erste, NK-Zellen zweite, Monozyten und MDSC dritte Priorität.

Als Reinigungsschritt wurde auf 4°C gekühlter FACS-Puffer in die 96-Well-Platte mit den Zellen pipettiert, anschließend zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Die Zellen wurden anschließend in der jeweiligen Antikörper-Zubereitung resuspendiert. In die Wells wurde FACS-Puffer pipettiert und der Inhalt resuspendiert, so dass jedes Zell-Pellet pro Well in 50µl einer Antikörper-FACS-Puffer-Lösung suspendiert war.

Alle anschließenden Schritte wurden bei möglichst geringer Beleuchtung durchgeführt, die Inkubationen erfolgten bei Dunkelheit, um die antikörpergebundenen Fluoreszenz-Farbstoffe zu schonen.

Die Zellen wurden mit den Antikörpern bei Dunkelheit für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden 200µl PBS in die Wells pipettiert und die Platten zentrifugiert (300g, 5min, 4°C). Der Überstand mit den ungebundenen Antikörpern wurde verworfen. Dieser Reinigungsschritt wurde wiederholt.

Um apoptotische und beschädigte Zellen von intakten Zellen im Durchflusszytometer unterscheiden zu können, wurde Lebend/Tot-Farbstoff (*Live/Dead viability dye*, Life Technologies GmbH, Darmstadt) eingesetzt. Die Zellen wurden darin 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben wie im vorhergehenden Schritt zweimal mit PBS gewaschen.

Im letzten Schritt wurden die Zellen zur Fixierung mittels einer 1,5% Formalinlösung bei 4°C für mindestens 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (300g, 5min, 4°C) und in 150µl FACS-Puffer pro Well resuspendiert.

Bis zur Messung (in der Regel am gleichen oder nächsten Tag) wurden die 96-Well-Platten in einem Kühlschrank gelagert.

4.5.1 Verwendetes Färbepanel

In Vorexperimenten mit Zellen und Beads (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) wurden optimale Spannungen für die Photomultiplier Tubes des LSRFortessa Durchflusszytometers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ermittelt und für alle Messungen beibehalten. B-Lymphozyten, Monozyten und MDSC wurden mittels der Antikörper-gebundenen Fluorophore Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin-Cyanin7 (APC-Cy7), Phycoerythrin (PE) und Pacific Blue (PB) gefärbt (s. Tabelle 3 und Tabelle 4). Das Färbepanel der NK-Zellen wurde im Gegensatz dazu um Brilliant Violet 605 (BV605) erweitert, um die zahlreichen Marker, deren Expression auf NK-Zellen untersucht wurde, in weniger verschiedenen Messungen zu akquirieren (s. Tabelle 5). Um die Streustrahlung jedes Fluorophors und die Autofluoreszenz der ungefärbten Zellen zu berücksichtigen, wurde eine Kompensationsmatrix für die B-Lymphozyten, Monozyten und MDSC und eine für NK-Zellen mittels FACSDiva-Software berechnet. Diese anfangs ermittelten Einstellungen wurden für alle Experimente verwendet.

| | <u>Antikörper-Färbung für B-Lymphozyten</u> | <u>Antikörper-Färbung für Aktivierte B-Lymphozyten</u> |
|---------------------|--|--|
| Fluorophor | Antigene Zielstruktur des Antikörpers | Antigene Zielstruktur des Antikörpers |
| FITC | CD27 (2,5µl) | CD27 (2,5µl) |
| APC-Cy7 | IgD (2,5µl) | IgD (2,5µl) |
| PE-Cy7 | CD24 (2,5µl) | CD95 (5µl) |
| PE | CD19 (1µl) | CD19 (1µl) |
| APC | CD38 (2,5µl) | CD21 (2,5µl) |
| PerCP-Cy5.5 | IgM (2,5µl) | CD86 (2,5µl) |
| Pacific Blue | Lebend/Tot-Farbstoff | Lebend/Tot-Farbstoff |

Tabelle 3: Antikörpervermittelte Färbung der B-Lymphozyten für die Durchflusszytometrie. Die angegebenen Zahlen in Klammern beziehen sich auf die verwendeten Volumina des verwendeten Antikörper-Fluorophor-Konjugats.

| | <u>Antikörper-Färbung für Monozyten</u> | <u>Antikörper-Färbung für MDSC</u> | <u>Antikörper-Färbung für MDSC Isotypen- Kontrolle</u> |
|---------------------|--|--|--|
| Fluorophor | Antigene Zielstruktur des Antikörpers | Antigene Zielstruktur des Antikörpers | Antigene Zielstruktur des Antikörpers |
| FITC | CD14 (2,5µl) | CD14 (2,5µl) | CD14 (2,5µl) |
| APC-Cy7 | CD16 (2,5µl) | CD16 (2,5µl) | CD16 (2,5µl) |
| PE-Cy7 | CD45 (1µl) | CD15 (2,5µl) | CD15 (2,5µl) |
| PE | CD62L (2,5µl) | CD40 (2,5µl) | IgGκ1 Mouse (2,5µl) |
| APC | SIGLEC-1 (2,5µl) | HLA-DR (5µl) | IgG2a, κ Mouse (5µl) |
| PerCp-Cy5.5 | CD69 (2,5µl) | CD33 (2,5µl) | CD33 (2,5µl) |
| Pacific Blue | Lebend/Tot-Farbstoff | Lebend/Tot-Farbstoff | Lebend/Tot-Farbstoff |

Tabelle 4: Antikörpervermittelte Färbung der Monozyten, Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) und der Isotyp-Kontrolle für die Durchflusszytometrie. Die Isotyp-Kontrolle erfolgte für die Fluorophore PE und APC. Die angegebenen Zahlen in Klammern beziehen sich auf die verwendeten Volumina des verwendeten Antikörper-Fluorophor-Konjugats.

| | <u>Antikörper-Färbung 1 für natürliche Killerzellen</u> | <u>Antikörper-Färbung 2 für natürliche Killerzellen</u> | <u>Antikörper-Färbung 3 für natürliche Killerzellen</u> |
|---------------------|---|---|---|
| Fluorophor | Antigene Zielstruktur des Antikörpers | Antigene Zielstruktur des Antikörpers | Antigene Zielstruktur des Antikörpers |
| FITC | CD94 (5µl) | CD3 (4µl) | CD69 (2,5µl) |
| APC-Cy7 | CD16 (2,5µl) | CD16 (2,5µl) | CD16 (2,5µl) |
| PE-Cy7 | — | CD197 (2,5µl) | — |
| PE | CD117 (5µl) | CD314 (5µl) | HLA-A2 (2,5µl) |
| APC | CD3 (4µl) | CD122 (5µl) | CD3 (4µl) |
| PerCp-Cy5.5 | CD56 (2,5µl) | CD56 (2,5µl) | CD56 (2,5µl) |
| Pacific Blue | Lebend/Tot-Farbstoff | Lebend/Tot-Farbstoff | Lebend/Tot-Farbstoff |
| BV605 | CD161 (2,5µl) | CD62L (2,5µl) | — |

Tabelle 5: Antikörpervermittelte Färbung der Natürlichen Killerzellen für die Durchflusszytometrie. Die unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren wurden mit drei verschiedenen Färbungen untersucht. Die angegebenen Zahlen in Klammern beziehen sich auf die verwendeten Volumina des verwendeten Antikörper-Fluorophor-Konjugats.

4.5.2 Messung und Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometer

Die fixierten Zellen wurden analysiert mit einem LSRFortessa Durchflusszytometer mit High Throughput Sampler von BD Biosciences (San Jose, CA, USA), gesteuert über die FACSDiva software (BD Biosciences). Das Gerät wurde mittels BD calibration beads wöchentlich geeicht.

Um die Streustrahlung jedes Fluorophors und die Autofluoreszenz der ungefärbten Zellen zu berücksichtigen, wurde eine Kompensationsmatrix für die Messung von B-Lymphozyten und Monozyten und eine für NK-Zellen ermittelt.

Die mittels LSRFortessa erhobenen Daten wurden mit der Software FlowJo (Version 7.65; Treestar Inc., Ashland, OR, USA) analysiert.

4.5.3 Gating-Strategien für die verschiedenen Populationen

Repräsentative Gating-Strategien für B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und MDSC für jede untersuchte Zellpopulation finden sich im Folgenden (Abb. 2-6). Allen Gating-Strategien gemeinsam ist die Beschränkung auf nur einzelne lebende Zellen durch Ausschluss von Zelldebris mittels Lebend-Tot-Farbstoff und Ausschluss von zusammenhaftenden Zellen mittels *Forward Scatter* (FSC) und *Side Scatter* (SSC). Die Beschreibung des weiteren Gatings findet sich in den Bildbeschriftungen.

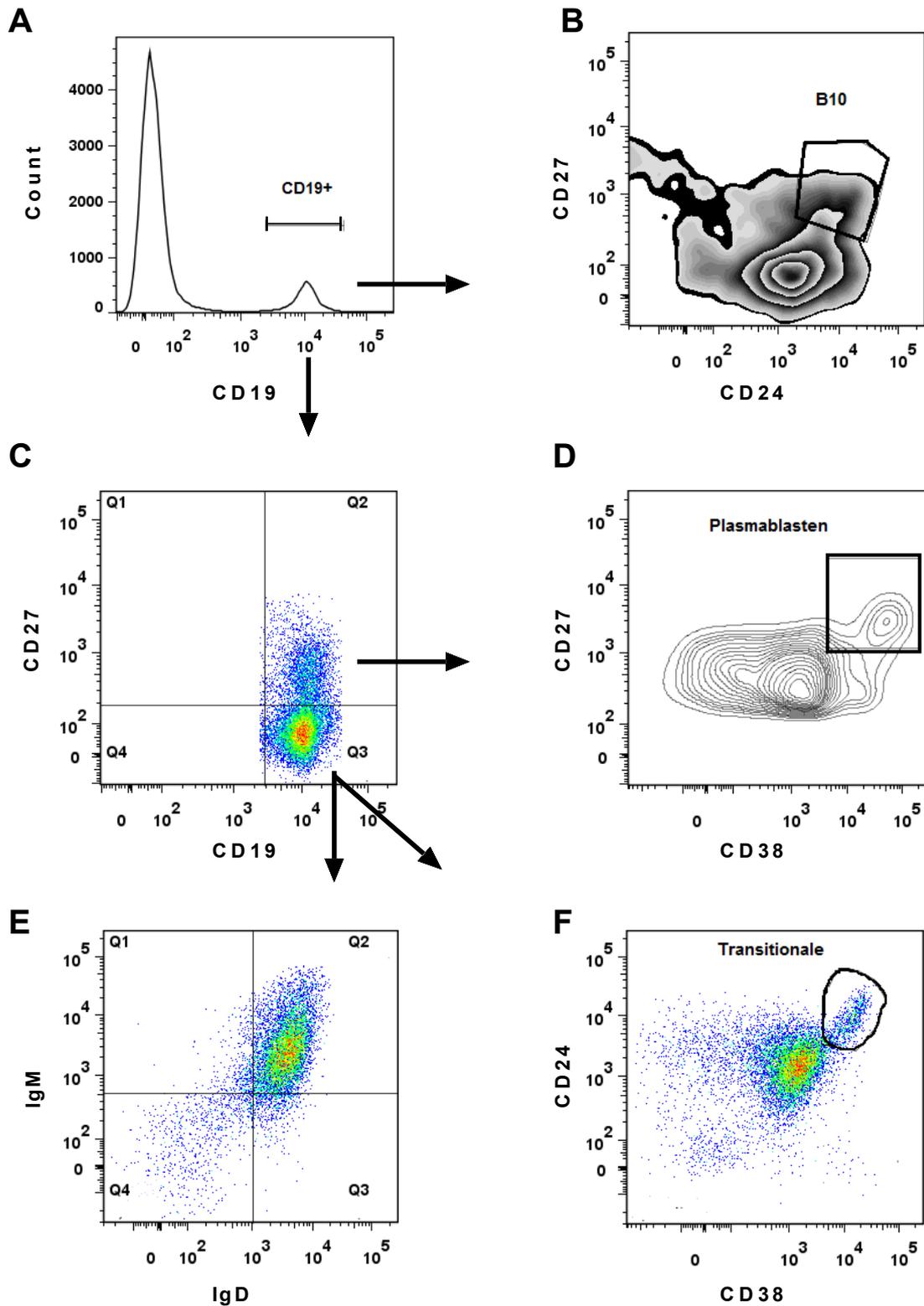


Abbildung 2: Gating für B-Lymphozyten. Nach der Auswahl von nur lebenden, einzelnen Zellen (nicht abgebildet) erfolgte die Auswahl der CD19+ B-Lymphozyten (A), daraus wurden direkt CD27+CD24+ B10 gated (B). Gating in CD27-positive und CD27-negative B-Lymphozyten (C). Aus den CD27+ wurden Plasmablasten gated (D). Aus den CD27-negativen wurden die IgM+IgD+ reifen, naiven B-Lymphozyten gated (E), sowie die CD24hiCD38hi transitionalen B-Lymphozyten (F).

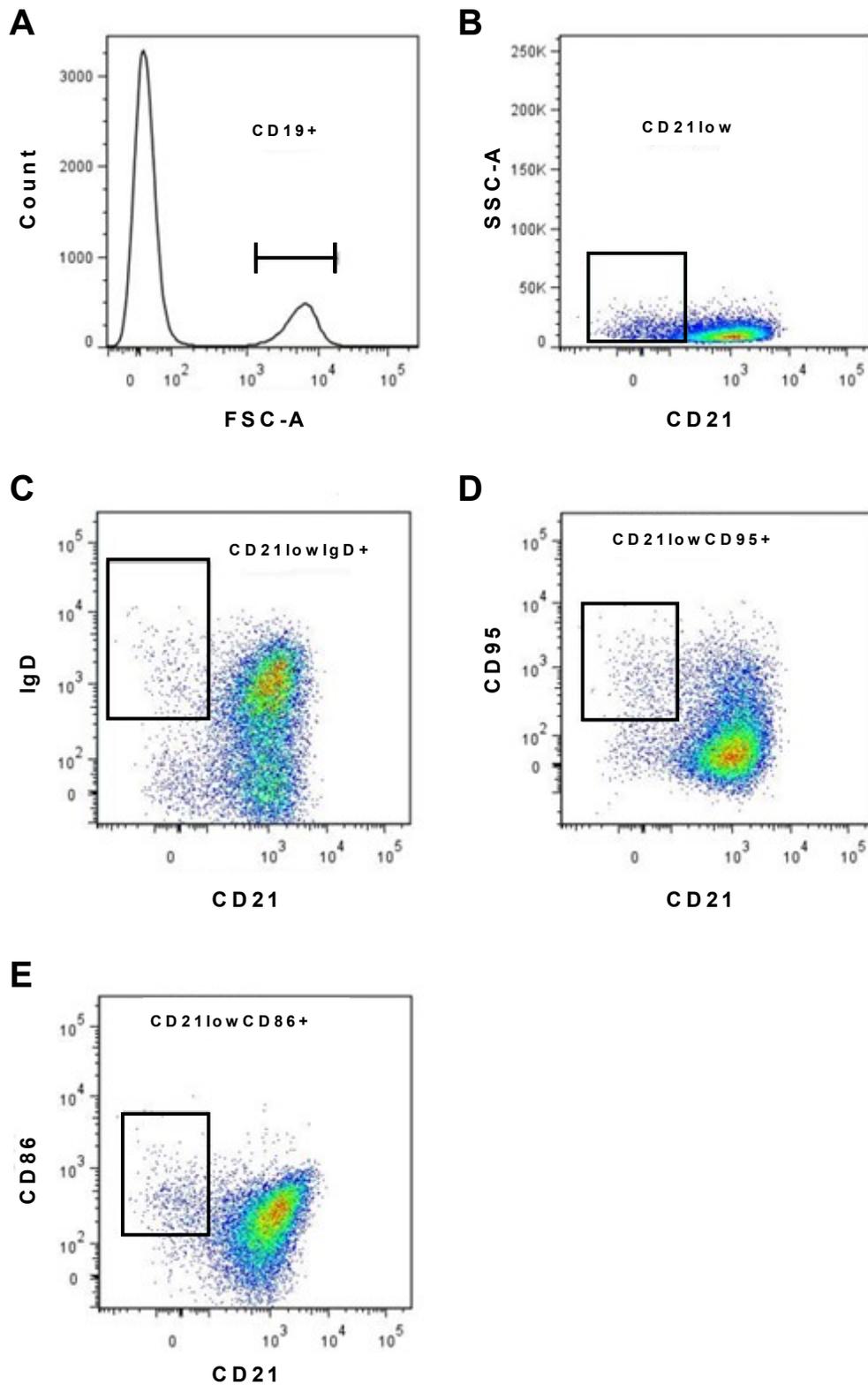


Abbildung 3: Gating für aktivierte B-Lymphozyten. Nach der Auswahl von nur lebenden, einzelnen Zellen (nicht abgebildet) erfolgte die Auswahl der CD19+ B-Lymphozyten (A). Aus diesen Zellen wurden dann fünf aktivierte Unterpopulationen ausgewählt mit der niedrigen Expression von CD21 (CD21low) (B) und der Expression der Marker IgD (C), CD95 (D), CD86 (E).

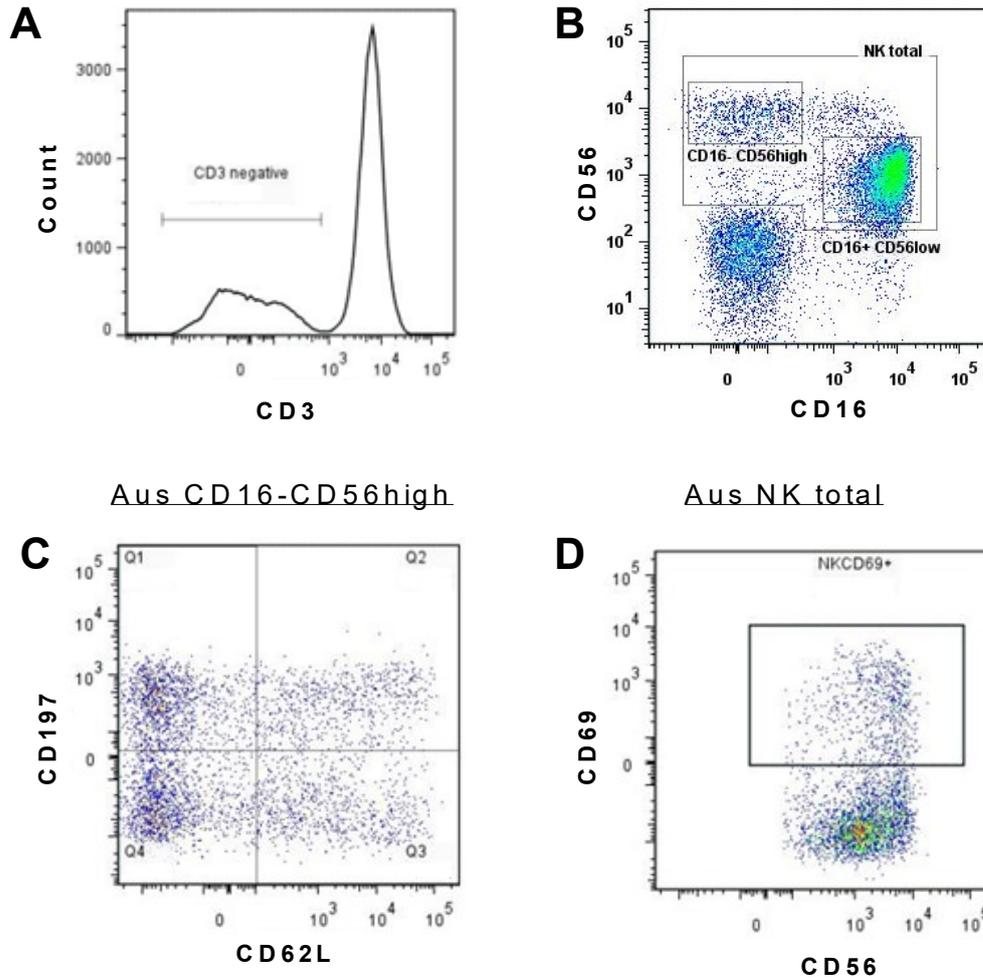


Abbildung 4: Gating für NK-Zellen (Teil 1). Nach der Auswahl von nur lebenden, einzelnen Zellen (nicht abgebildet) erfolgte die Auswahl von CD3 negativen Zellen (A). Daraus wurden CD16-CD56high-, CD16+CD56low und NK total gated (B). Aus dem Gate CD16-CD56high wurden CD197 und CD62L exprimierende Zellen gewählt (C), aus dem Gate NK total wurde CD69 exprimierende Zellen gewählt (D).

Aus CD56low

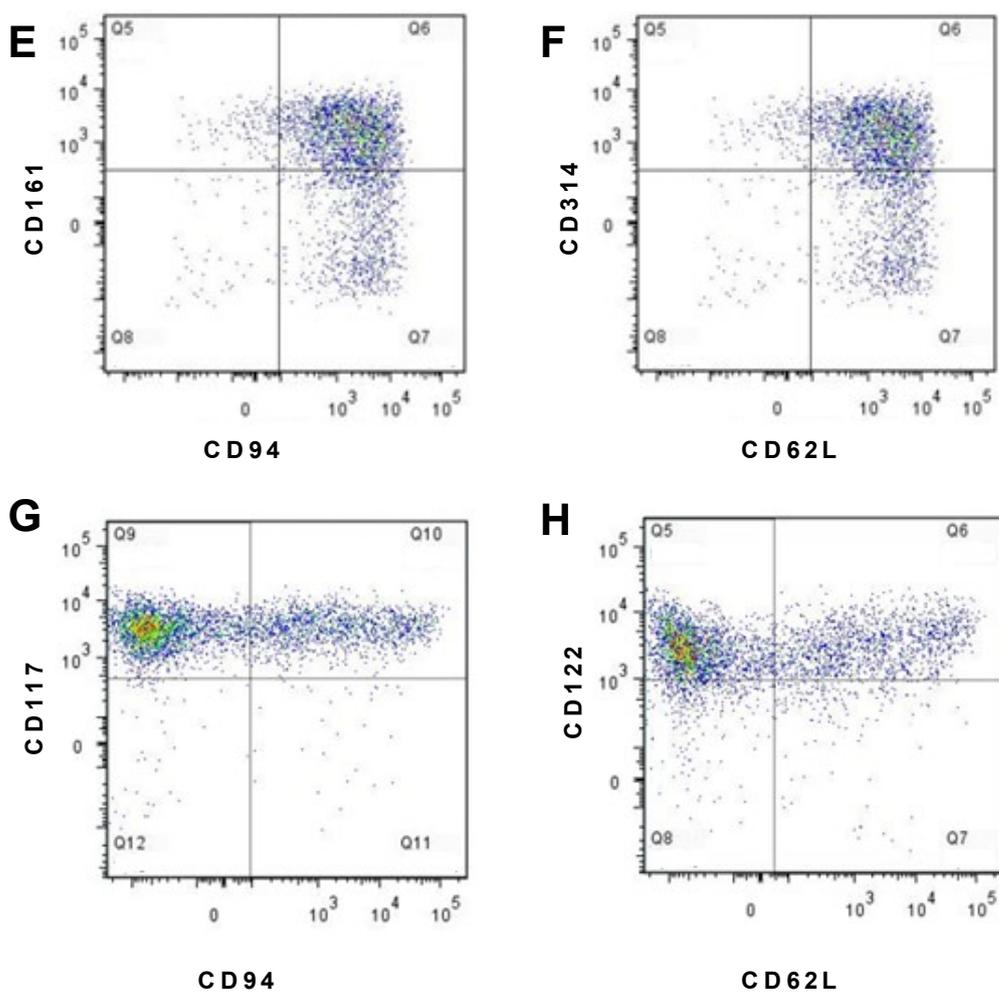


Abbildung 5: Gating für NK-Zellen (Teil 2). Auswahl der Zellen aus CD16+CD56low (Abb. 4B), daraus wurden die Expression von CD161, CD94 (E), CD314, CD62L (F), CD117, CD94 (G), CD122 und CD62L(H) ermittelt.

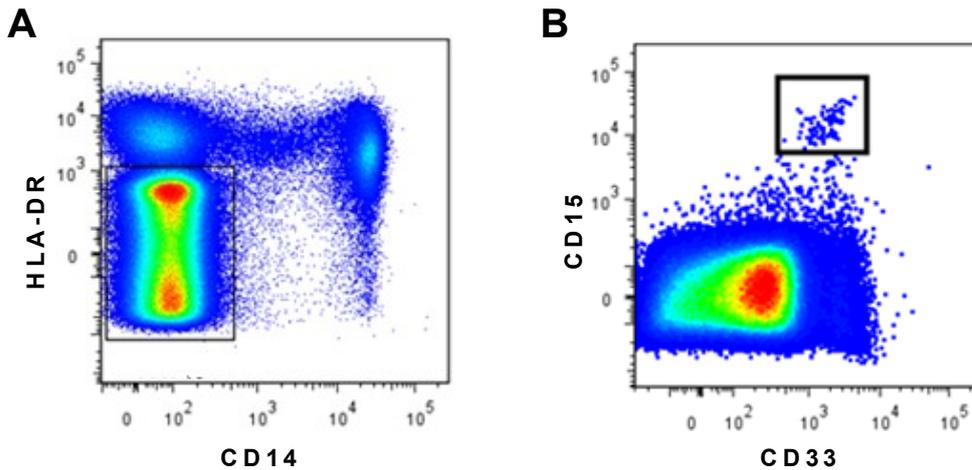


Abbildung 6: Gating für Myeloide Suppressorzellen (MDSC). Nach der Auswahl von nur lebenden, einzelnen Zellen (nicht abgebildet) erfolgte die Auswahl von HLA-DR und CD14 negativen Zellen (A), daraus Auswahl von Myeloiden Suppressorzellen vom granulozytären Typ (CD15, CD33) (B).

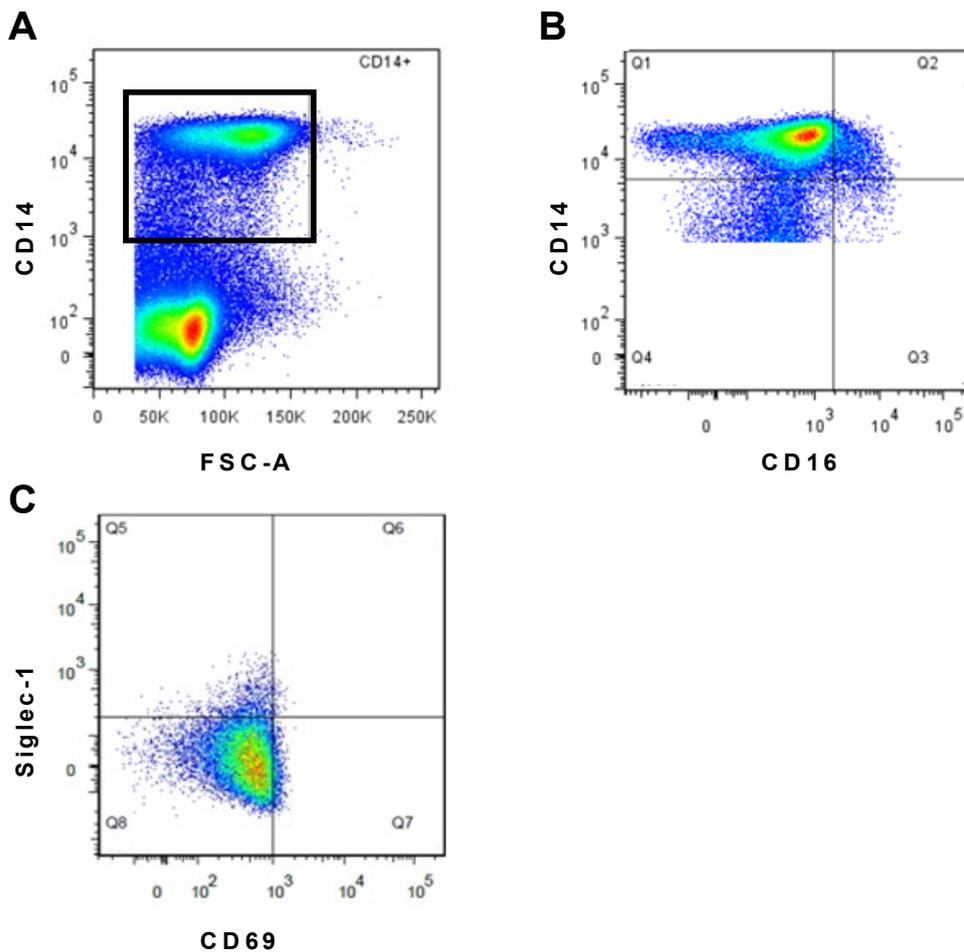


Abbildung 7: Gating für Monozyten-Untergruppen und Siglec-1. Auswahl von nur lebenden, einzelnen Zellen (nicht abgebildet), daraus erfolgte die Auswahl von CD14⁺ Zellen (A). Aus (A) folgte die Auswahl der vier Monozyten-Untergruppen (CD14^{high}CD16⁺, CD14^{low}CD16⁺, CD14^{high}CD16⁻, CD14^{low}CD16⁻) mittels der Expression von CD14 und CD16 (B). Aus (B) erfolgte die Auswahl von Siglec-1 exprimierenden Monozyten (C).

4.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software Prism 6 von Graphpad (La Jolla, CA, USA). Die Mittelwerte der in den Studiengruppen DiMelli und TEENDIAB erhobenen Daten zu den jeweiligen Zellhäufigkeiten im peripheren Blut der Probanden wurden mittels zweiseitigem Student t-Test bei einem Signifikanzniveau α mit $\alpha = 0,05$ auf Unterschiede getestet. Für die α -Fehler-Akkumulation durch multiples Testen an derselben Stichprobe wurde mittels Bonferroni-Methode korrigiert. Es wurde für 21 verschiedene Tests an derselben Stichprobe das Signifikanzniveau des t-Tests auf $\alpha^* = \frac{0,05}{21} \approx 2,38 \times 10^{-3}$ korrigiert. Testergebnisse mit P-Wert $p < \alpha^*$ wurden als signifikant erachtet. Lineare Regressionsanalysen und Korrelationsanalysen wurden verwendet, um den Zusammenhang von Alter und der Häufigkeit von transitionalen B-Lymphozyten zu untersuchen.

5 Ergebnisse

In 15 aufeinander folgenden Experimenten wurden die Proben nach zufälliger Reihenfolge ausgewählt und verblindet verarbeitet. Die zu untersuchenden Zellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometer erfasst und mit der Software FlowJo ausgewertet. Nachdem alle Proben auf diese Weise ausgewertet waren, wurde die Studie entblindet und es erfolgte die Zuordnung zu den Studienprobanden und ein Vergleich aller ermittelten Daten zwischen den beiden Kohorten.

Ausgeschlossen wurden Messungen mit sehr wenigen lebenden Zellen (<30.000) oder einer fehlerhaften Färbung und damit nicht möglicher Beurteilbarkeit. Waren bei einer Zellprobe nicht genügend Zellen für alle Antikörper-Färbungen vorhanden, wurden die Zellen entsprechend der vorher festgesetzten Präferenzreihenfolge verarbeitet (vgl. 4.5, S. 38): 1. B-Lymphozyten, 2. NK-Zellen, 3. Monozyten und MDSC. Entsprechend sind bei den B-Lymphozyten die meisten auswertbaren Proben und bei den Monozyten die wenigsten vorhanden (vgl. Tabelle 6, S.61).

5.1 B-Lymphozyten

Es wurden hier 42 Kinder mit neu manifestiertem T1D und 48 Kinder ohne Diabetes im Alter von 8,0-14,8 Jahren miteinander verglichen. Untersucht wurden folgende Subpopulationen und Entwicklungsstufen von B-Lymphozyten und deren Anteil an den gesamten CD19+ B-Lymphozyten: reife naive IgD+IgM+ B-Lymphozyten (Abb. 8A), Plasmablasten (Abb. 8B), transitionale B-Lymphozyten (Abb. 8C) und B10 (Abb. 8D).

Die untersuchten Populationen von B-Lymphozyten waren bei Kindern mit neu manifestiertem T1D und denen ohne Diabetes gleich häufig, mit der Ausnahme der transitionalen B-Lymphozyten: Dort fiel eine statistisch signifikante ($p=2,10 \times 10^{-3}$) Verminderung des Anteils der transitionalen B-Lymphozyten an den gesamten CD19+ B-Lymphozyten bei den Kindern mit neu manifestiertem T1D ($6,44 \pm 0,56\%$, $n=42$) gegenüber den Kindern ohne Diabetes ($8,86 \pm 0,53\%$, $n=48$) auf. Die ebenfalls als immunregulatorisch geltenden B10-Lymphozyten wiesen hingegen keine numerischen Unterschiede auf (Abb. 8D).

Die untersuchten Ausreifungsstufen Plasmablasten und reife naive (IgD+IgM+) B-Lymphozyten waren in ihrer Anzahl bei den Kindern mit neu manifestiertem T1D nicht verändert im Vergleich zu den Kindern ohne Diabetes (Abb. 8A).

Ebenfalls wurde das Auftreten von aktivierten B-Lymphozyten mit einer niedrigen Expression von CD21 (CD21^{low}) untersucht, sowie die Expression der aktivierenden Rezeptoren CD86, CD95 und IgD auf diesen CD21^{low} B-Lymphozyten (Abb. 9). Es wurden hier 42 Kinder mit neu manifestiertem T1D aus der DiMelli-Studie und 49 Kinder ohne Diabetes aus der TEENDIAB-Studie untersucht in einem Alter von 8,0 bis 14,8 Jahren.

Die B-Lymphozyten der Kinder mit T1D waren nicht verstärkt oder verändert aktiviert im Vergleich zu den B-Lymphozyten der Kinder ohne Diabetes. Es ließen sich bei den Kindern mit neu manifestiertem T1D weder veränderte Anzahlen von CD21^{low} B-Lymphozyten (Abb. 9A), noch eine veränderte Expression von CD95 (Abb. 9B), CD86 (Abb. 9C) oder IgD (Abb. 9D) auf diesen nachweisen.

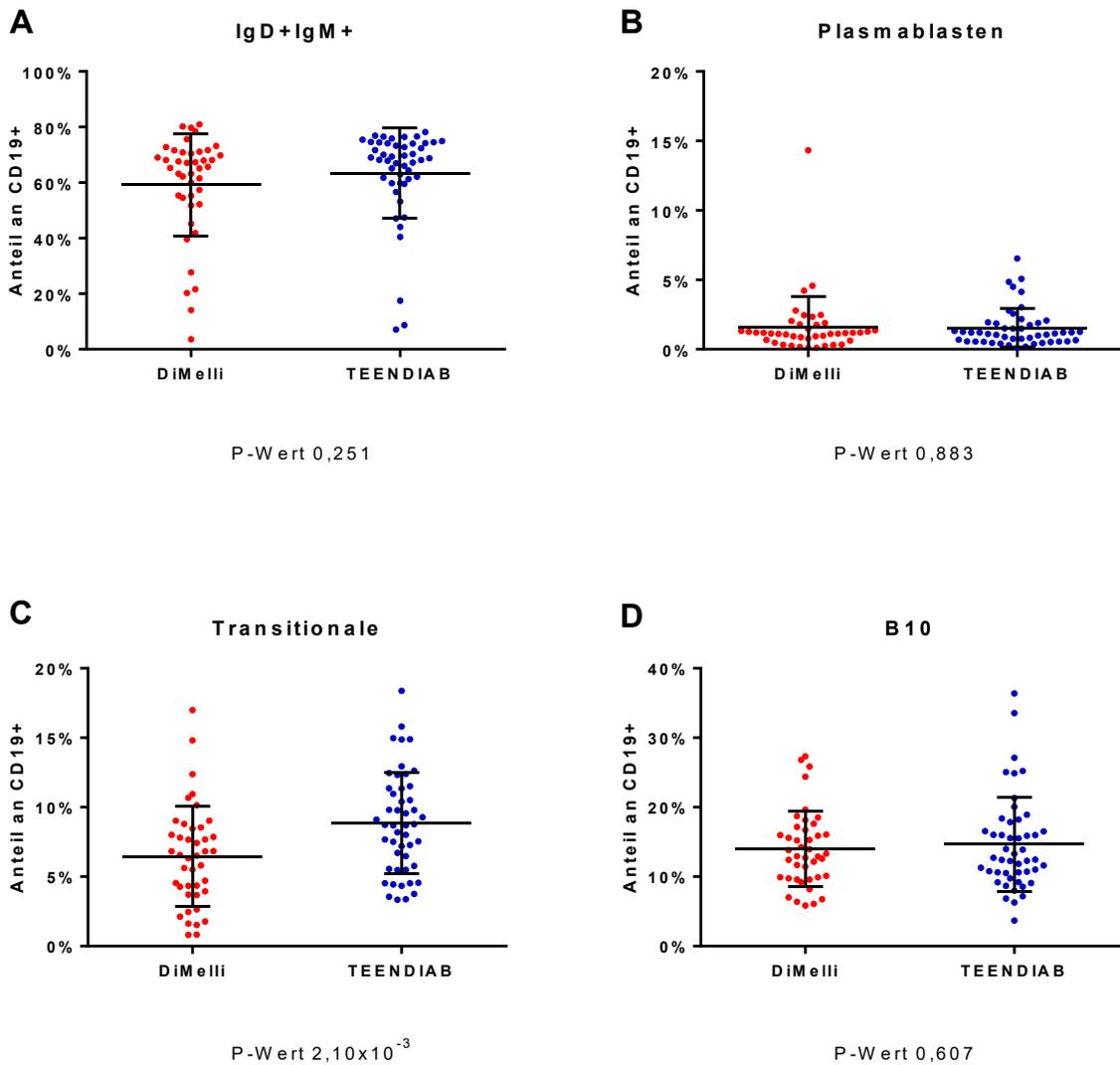


Abbildung 8: Untergruppen von B-Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D. B-Lymphozyten bei Kindern mit neu manifestiertem T1D (DiMelli) und gleichaltrigen Kindern ohne Diabetes (TEENDIAB). Es sind die Entwicklungsstufen reife naive B-Lymphozyten (IgD+IgM+) (A) und Plasmablasten (B) als Anteil der CD19+ B-Lymphozyten dargestellt. Darunter finden sich die regulatorischen transitionalen B-Lymphozyten (C) und B10 (D). Die Prozentzahlen an der Ordinate beziehen sich auf den Anteil des jeweiligen Zelltyps an der Gesamtheit der CD19+ B-Lymphozyten. Angezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Der P-Wert des zweiseitigen t-Tests findet sich unter dem jeweiligen Diagramm.

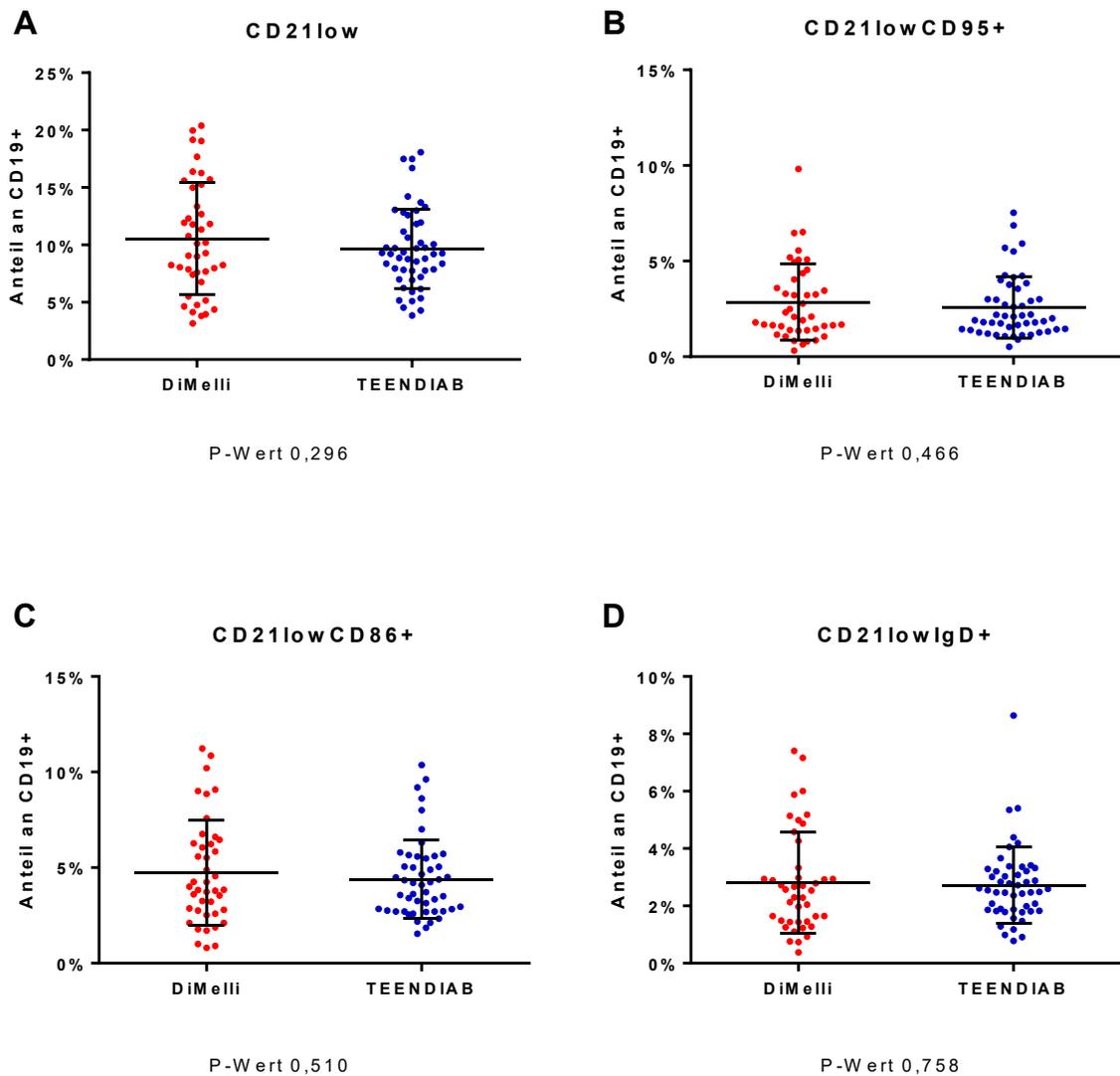


Abbildung 9: B-Lymphozyten mit der niedrigen Expression von CD21 (CD21low) im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D. CD21low B-Lymphozyten bei Kindern mit neu manifestiertem T1D (DiMelli) und gleichaltrigen Kindern ohne Diabetes (TEENDIAB). CD21low als Anteil an den gesamten CD19+ B-Lymphozyten (A). Graphen B-D zeigen die gleichzeitige Expression der Aktivierungsmarker CD95 (B), CD86 (C) und IgD (D) auf diesen CD21low B-Lymphozyten als Anteil der gesamten CD19+ B-Lymphozyten. Angezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Der P-Wert des zweiseitigen t-Tests findet sich unter dem jeweiligen Diagramm.

5.2 Natürliche Killerzellen

Es wurden NK-Zellen von 33 Kindern mit neu manifestiertem T1D und 42 Kindern ohne Diabetes miteinander verglichen. Auf NK-Zellen wurden die Expression der Aktivierungsmarker CD117 (Abb. 10A), NKG2D/CD314 (Abb. 10B), CD122 (Abb. 10C), CD69 (Abb. 10D), CD62L und CD197 (Abb. 10E), und der Inhibitionsmarker CD94 (Abb. 10F), CD161 (Abb. 10G) untersucht. CD197 und CD62L wurden auf CD56^{high} NK-Zellen untersucht, da sie vorwiegend dort exprimiert werden. Die übrigen Marker wurden auf den häufiger vorkommenden CD56^{low} NK-Zellen untersucht. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den Populationen der NK-Zellen oder der Expression der untersuchten Oberflächenmarker auf NK-Zellen zwischen den Kindern mit neu manifestiertem T1D und den Kindern ohne Diabetes für das geforderte Signifikanzniveau $p < 2,38 \times 10^{-3}$ finden.

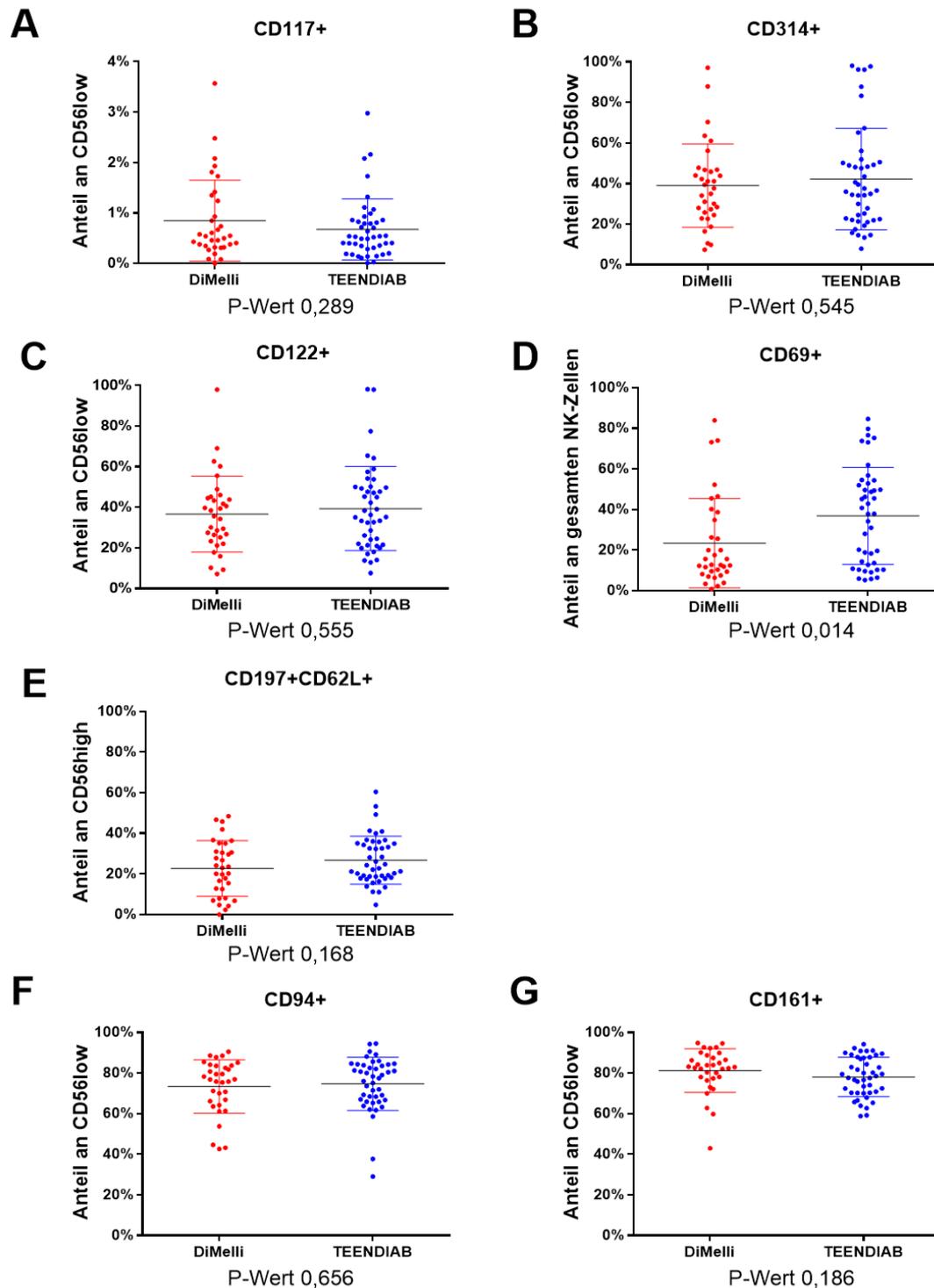


Abbildung 10: Oberflächenrezeptorexpression auf Natürlichen Killerzellen im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D. Es ist die Oberflächenrezeptorexpression auf Natürlichen Killerzellen bei Kindern mit neu manifestiertem T1D (DiMelli) und gleichaltrigen Kindern ohne Diabetes (TEENDIAB) dargestellt. Die Graphen A-C zeigen die Expression der aktivierenden Marker CD117, CD314 und CD122 auf CD56low NK-Zellen. Graph D zeigt die Expression von CD69 auf allen NK-Zellen. Graph E die Expression von CD197 und CD62L auf CD56high NK-Zellen. Die Graphen F und G zeigen die Expression der inhibitorischen Oberflächenrezeptoren CD94 und CD161 auf CD56low NK-Zellen. Angezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Der P-Wert des zweiseitigen t-Tests findet sich unter dem jeweiligen Diagramm.

5.3 Monozyten

Es wurden Monozyten von 29 Kindern mit neu manifestiertem T1D und 45 Kindern ohne Diabetes im Alter von 8,0 bis 14,8 Jahren auf die beiden folgenden Fragestellungen untersucht: Lässt sich die abweichende Zusammensetzung der CD14/CD16-Populationen wie bei *Irvine, Gallego et al.* auch bei den Kindern aus den Studien DiMelli und TEENDIAB reproduzieren? Lässt sich eine vermehrte Expression von Siglec-1 auf CD14+ Monozyten in einer der beiden Gruppen nachweisen?

Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Monozyten-Untergruppen nachweisen. Die vorbeschriebene Verminderung in den CD14highCD16+ Populationen bei Kindern mit T1D ließ sich nur tendenziell ermitteln (Abb. 11B) und erreichte kein statistisch signifikantes Niveau ($p=0,246$). Die CD14lowCD16- Monozytenpopulation erreichte ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Kindern mit neu manifestiertem T1D im Vergleich zu den Kindern ohne Diabetes ($p=0,124$, Abb. 11 D). Die übrigen Untergruppen von Monozyten, CD14highCD16- und CD14lowCD16+ zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Kindern mit neu manifestiertem T1D und den Kindern ohne Diabetes ($p=0,388$ bzw. $p=0,647$, Abb. 11 A, C).

Zwischen den beiden Kohorten konnte keine im Mittel veränderte Expression von Siglec-1 auf CD14+ Monozyten gefunden werden ($p=0,877$, Abb. 11E). Auffällig ist jedoch eine große Spannweite im Anteil von Siglec-1-positiven Monozyten an den gesamten CD14+CD16- Monozyten in beiden Kohorten.

Ein Problem bei der Beurteilung von Monozyten ergibt sich durch ihr relativ seltenes Auftreten im peripheren Blut. Es wurde versucht, dem entgegenzuwirken, indem für die Messungen der Monozyten mindestens 500.000 Zellen pro Färbung verwendet wurden. Trotzdem lieferten manche Proben nur sehr geringe Zahlen an auswertbaren CD14+ Zellen. Daher wurden nur Proben in die Auswertung aufgenommen, die mindestens 1000 CD14+ Zellen aufwiesen (Minimum: 1244, Maximum: 59.900, Mittelwert gerundet: 16.536, Median: 12.600)

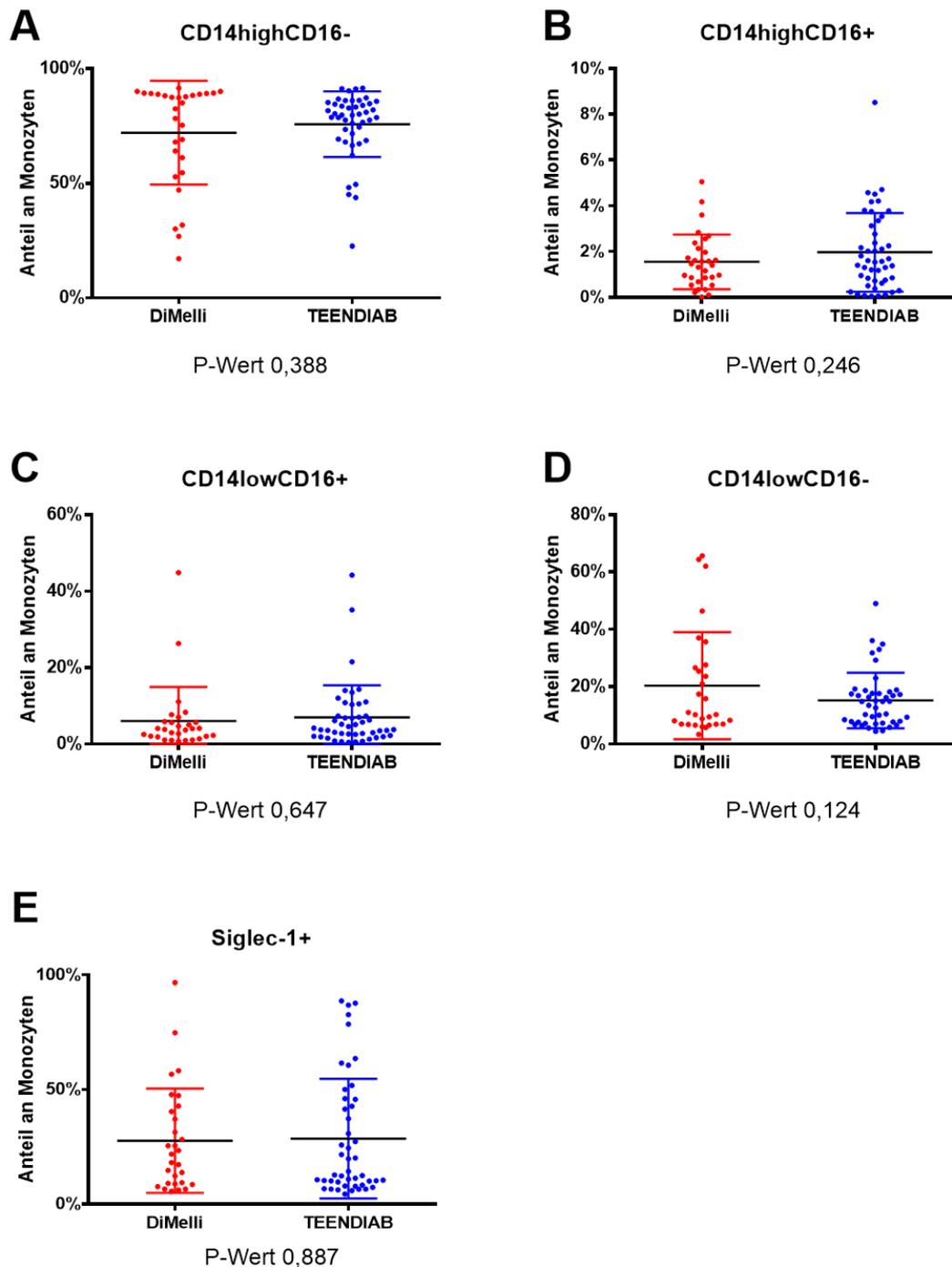


Abbildung 11: Untergruppen von Monozyten und Expression von Siglec-1 im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D. Monozyten-Untergruppen bei Kindern mit neu manifestiertem T1D (DiMelli) und gleichaltrigen Kindern ohne Diabetes (TEENDIAB). Es sind die CD14^{high}CD16⁻ Monozyten (A), CD14^{high}CD16⁺ Monozyten (B), CD14^{low}CD16⁺ Monozyten (C) und die CD14^{low}CD16⁻ Monozyten (D) je als Anteil der gesamten Monozyten dargestellt. Der Anteil Siglec-1-positiver Monozyten als Anteil an den gesamten Monozyten findet sich in (E). Angezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Der P-Wert des zweiseitigen t-Tests findet sich unter dem jeweiligen Diagramm.

5.4 Myeloide Suppressorzellen

Es wurde an 27 Kindern mit neu manifestiertem T1D und 44 Kindern ohne Diabetes die Häufigkeit von MDSC im peripheren Blut verglichen (Abb. 12).

In beiden Gruppen zeigten sich ähnliche Häufigkeiten von MDSC im peripheren Blut ($p=0,241$). Es zeigten sich große interindividuelle Unterschiede in der Häufigkeit der MDSC, jedoch ließ sich keine andersartige Verteilung der MDSC bei den Typ-1-Diabetikern (F-Test: $p=0,314$) nachweisen.

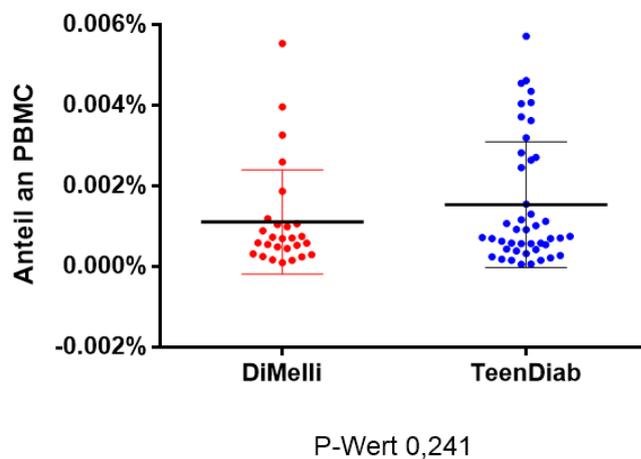


Abbildung 12: Myeloide Suppressorzellen im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D. Anteil der Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) an mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) bei Kindern mit neu manifestiertem T1D (DiMelli) und Kindern ohne Diabetes (TEENDIAB). Angezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Der P-Wert des zweiseitigen t-Tests findet sich unter dem Diagramm.

5.5 Auswirkung der Anzahl der transitionalen B-Lymphozyten auf den Typ-1-Diabetes

Nach Bonferroni-Korrektur für das multiple Testen bleibt nur noch die Verminderung der transitionalen B-Lymphozyten bei den frisch diagnostizierten Diabetikern statistisch signifikant. Es fällt auf, dass sich in beiden Kohorten der Anteil der transitionalen B-Lymphozyten in einem großen Bereich bewegt (0,81%-16,99% DiMelli und 3,34-18,38% in TEENDIAB). Dies ist anzunehmen, da eine starke Abhängigkeit der transitionalen B-Lymphozyten vom Alter nachgewiesen wurde (Morbach, Eichhorn et al. 2010, Thompson, Pekalski et al. 2014). Um diese Abhängigkeit zu überprüfen und damit auch die Messung zu validieren, wurde die Abhängigkeit des Anteils von transitionalen B-Lymphozyten an den gesamten CD19+ B-Lymphozyten vom Alter der Probanden mittels linearer Regression und mittels Korrelationsanalyse untersucht (Abb. 12). Die lineare Regressionsgerade (schwarze Linie in Abbildung 13, S.59) ist signifikant von $Y=0$ verschieden (P-Wert= 0,035). Der Korrelationskoeffizient r nach Pearson beträgt $r = -0,223$. Somit bestätigt sich eine negative Korrelation der Zellpopulation mit dem Alter, hier schon bei einer Altersspanne von 6,8 Jahren über alle Probanden.

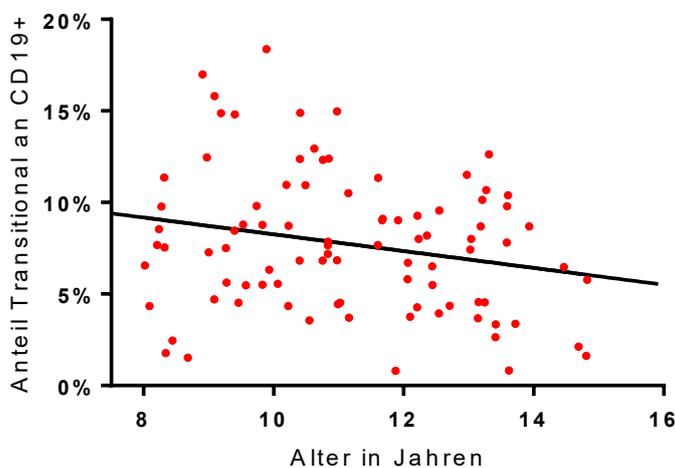


Abbildung 13: Abhängigkeit der transitionalen B-Lymphozyten vom Alter. 90 Kinder aus beiden Studien. Auftragung des Alters gegen den prozentualen Anteil von transitionalen B-Lymphozyten an den gesamten CD19+ B-Lymphozyten. Die ermittelte Regressionsgerade ist in schwarz dargestellt.

Von der These ausgehend, dass diese Zellen eine immunsuppressive Funktion haben und die Autoimmunreaktion beim T1D eindämmen, kann man den Schluss ziehen, dass ein hoher prozentualer Anteil dieser Zellen im Blut mit einem höheren Überleben an insulinproduzierenden Betazellen assoziiert sein könnte. Die größere residuale Insulinproduktion könnte indirekt messbar sein durch die C-Peptid-Ausschüttung (Yosten und Kolar 2015, Saisho 2016) der Probanden. Ebenso könnte sie sich in einer besseren glykämischen Kontrolle äußern, abschätzbar durch den Anteil von glykiertem Hämoglobin A1 am Gesamthämoglobin (HbA1c-Wert) als etablierten Marker. Bei den untersuchten Probanden war in fast allen Fällen der HbA1c und die Produktion von C-Peptid zum Zeitpunkt der Entnahme der PBMC bekannt. Um einen möglichen Einfluss der transitionalen B-Lymphozyten auf die residuale Insulinproduktion zu untersuchen, erfolgte die Antragung gegen die Werte von C-Peptid und HbA1c bei den Kindern mit neu manifestiertem T1D aus der DiMelli-Studie. Ein Zusammenhang wurde mittels linearer Regressionsanalyse getestet.

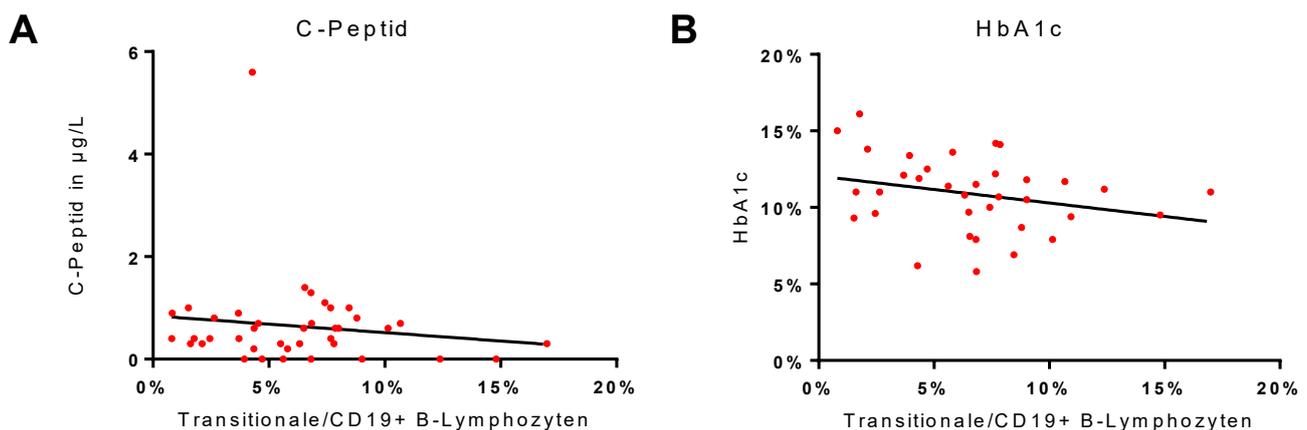


Abbildung 14: Abhängigkeit von C-Peptid (A) und HbA1c (B) vom Anteil der transitionalen B-Lymphozyten an CD19+ B-Lymphozyten. Kinder mit T1D aus der DiMelli-Studie. Der Nüchternwert des C-Peptid war bei 40 Kindern bekannt, der HbA1c bei 36 Kindern. Es erfolgte jeweils die Auftragung gegen den Anteil der transitionalen B-Lymphozyten an CD19+ B-Lymphozyten. Beide Regressionsgeraden sind nicht signifikant von $Y=0$ verschieden (P-Wert=0,422 (A) und P-Wert= 0,117 (B)).

Es zeigte sich keine Korrelation von HbA1c und C-Peptid zum Anteil der transitionalen B-Lymphozyten an den gesamten CD19+ B-Lymphozyten. Somit ließ sich kein signifikanter Einfluss der relativen Anzahl von transitionalen B-Lymphozyten finden.

5.6 Überblick über die Messergebnisse

Ein Überblick über alle Messergebnisse, inklusive der Anzahl der Messungen pro Kohorte, der Mittelwerte und Standardfehler, sowie der Ergebnisse der t-Tests findet sich in Tabelle 6.

| | | DiMelli-Studie | | TEENDIAB-Studie | | |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|---|----------------------------|--|-------------------------------|
| Zellpopulation | | Anzahl der Messungen | Mittelwert ± Standardfehler in %; | Anzahl der Messungen | Mittelwert ± Standardfehler in % | p-Wert |
| B-Lymphozyten | B10 | 42 | 13,99 ± 0,84 | 48 | 14,66 ± 0,97 | 0,607 |
| | Transitionale | 42 | 6,44 ± 0,56 | 48 | 8,86 ± 0,53 | 2,10 × 10⁻³ |
| | Reife, naive | 42 | 59,25 ± 2,85 | 48 | 63,50 ± 2,37 | 0,381 |
| | Plasmablasten | 42 | 1,60 ± 0,34 | 48 | 1,54 ± 0,20 | 0,882 |
| | CD21low | 42 | 10,55 ± 0,76 | 49 | 9,63 ± 0,50 | 0,298 |
| | CD21lowCD86+ | 42 | 4,73 ± 0,42 | 49 | 4,40 ± 0,30 | 0,510 |
| | CD21lowCD95+ | 42 | 2,84 ± 0,31 | 49 | 2,56 ± 0,23 | 0,467 |
| | CD21lowIgD+ | 42 | 2,82 ± 0,27 | 49 | 2,72 ± 0,19 | 0,758 |
| Natürliche Killerzellen | CD117+ an CD56low | 33 | 0,85 ± 0,14 | 44 | 0,67 ± 0,09 | 0,260 |
| | CD94+ an CD56low | 33 | 73,35 ± 2,30 | 44 | 74,70 ± 1,97 | 0,622 |
| | CD161+ an CD56low | 33 | 81,19 ± 1,87 | 44 | 78,06 ± 1,47 | 0,186 |
| | CD197+CD62L+ an CD56 high | 33 | 22,73 ± 2,38 | 44 | 26,78 ± 1,78 | 0,168 |
| | CD314+ an CD56low | 33 | 39,00 ± 3,57 | 44 | 42,24 ± 3,76 | 0,545 |
| | CD122+ an CD56low | 33 | 36,61 ± 3,26 | 44 | 39,32 ± 3,12 | 0,555 |
| | CD69+ an gesamten NK-Zellen | 33 | 23,41 ± 3,83 | 44 | 36,85 ± 3,65 | 0,014 |
| Monozyten | Siglec-1+ | 29 | 27,65 ± 4,23 | 46 | 28,57 ± 3,86 | 0,877 |
| | CD14highCD16+ | 29 | 1,54 ± 0,22 | 45 | 1,93 ± 0,26 | 0,246 |
| | CD14highCD16- | 29 | 72,08 ± 4,20 | 45 | 75,80 ± 2,14 | 0,388 |
| | CD14lowCD16+ | 29 | 6,02 ± 1,66 | 45 | 6,96 ± 1,24 | 0,647 |
| | CD14lowCD16- | 29 | 20,37 ± 3,46 | 45 | 15,23 ± 1,45 | 0,124 |
| MDSC | MDSC | 27 | (1,11 ± 0,25) × 10 ⁻³ | 44 | (1,53 ± 0,23) × 10 ⁻³ | 0,241 |

Tabelle 6: Untersuchte Zellpopulationen, Anzahl der Messungen pro Kohorte DiMelli oder TEENDIAB, Messergebnisse mit Standardfehler. Die Prozentzahlen beziehen bei den Untergruppen von B-Lymphozyten auf den Anteil der Untergruppe an allen CD19+ B-Lymphozyten, bei den NK-Zellen auf den Anteil an der jeweils angegebenen großen NK-Zell-Untergruppe, bei den Monozyten-Untergruppen auf den Anteil der Untergruppe an allen Monozyten und bei den MDSC auf den Anteil an allen PBMC. Der P-Wert wurde durch zweiseitigen t-Test ermittelt. Ergebnisse mit $p < 2,38 \times 10^{-3}$ wurden als signifikant erachtet.

6 Diskussion

Der T1D wird als eine durch T-Lymphozyten vermittelte Autoimmunerkrankung erachtet. Die Aktivität der T-Lymphozyten wird jedoch durch weitere zelluläre Komponenten des Immunsystems deutlich beeinflusst. In dieser Arbeit sollten bisher wenig beachtete potentielle „Akteure“ in der autoimmunen Pathogenese des T1D untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Immunzellen ausgewählt, die entweder bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. dem Systemischen Lupus Erythematoses, einer pathologischen Veränderung unterliegen oder die in Tiermodellen des T1D pathologisch verändert sind, aber bei Menschen mit T1D noch nicht oder nur unzureichend untersucht wurden.

Die ausgewählten Immunzellen umfassten B-Lymphozyten, mit verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Untergruppen und Entwicklungsstufen, Natürliche Killerzellen und deren Expression pro- und antiinflammatorischer Rezeptoren, Monozyten mit ihren Untergruppen und Myeloide Suppressorzellen (s. Tabelle 1, S. 13). Für diese Zellen wurde eine Antikörper-vermittelte Färbung für die Durchflusszytometrie entwickelt. Damit wurde die Häufigkeit dieser Zellen im peripheren Blut bei Kindern mit neumanifestiertem T1D und gleichaltrigen Kindern ohne T1D, aber mit T1D in der Familienanamnese, untersucht.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass Kinder mit neumanifestiertem T1D signifikant weniger transitionale B-Lymphozyten (CD19+CD27-CD24^{hi}CD38^{hi}) im peripheren Blut aufweisen als die gleichaltrigen Kinder ohne T1D.

Keine Unterschiede wurden bei den übrigen untersuchten Zellen des B-Zell-Kompartiments gefunden: Plasmablasten, B10 und naive reife B-Lymphozyten waren in ihrer Anzahl bei den Kindern mit T1D nicht zahlenmäßig verändert.

Die Expression von Siglec-1 auf Monozyten war im Mittel gleich bei Kindern mit T1D und den Kindern ohne Diabetes. Beide Kohorten zeigten eine große interindividuelle Streuung in der Expression von Siglec-1. Ebenso war keine Veränderung bei den Untergruppen der Monozyten nachzuweisen.

Ebenso wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich zwischen den beiden Gruppen für NK-Zellen und MDSC gefunden.

Diese Ergebnisse sind neu in Bezug auf die mutmaßliche Rolle, die B-Lymphozyten und insbesondere die immunsuppressiv wirkenden transitionalen B-Lymphozyten in der Pathogenese des T1D spielen. Dieser Zelltyp wurde bisher noch nicht bei neu diagnostizierten Diabetikern (hier mediane Zeit seit Diagnose 10 Tage) untersucht. Die in dieser Studie bei neu manifestiertem T1D beobachtete Verminderung der Zellzahl der transitionalen B-Lymphozyten wurde bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem SLE oder der Immunthrombozytopenie beschrieben (Blair, Norena et al. 2010, Li, Zhong et al. 2012, Flores-Borja, Bosma et al. 2013).

6.1 Diskussion der Methoden

Eine Stärke der vorliegenden Arbeit ist, dass die aus der DiMelli-Studie ausgesuchten Typ-1-Diabetiker sehr kurz nach der Erstdiagnose erfasst wurden (Median 10 Tage, Mittelwert 12,5 Tage nach Erstdiagnose) und alle für mindestens zwei Inselzell-Autoantikörper positiv getestet waren.

Weiterhin wurden alle untersuchten PBMC im gleichen Labor nach standardisierten Verfahrensweisen (SOPs) aufbereitet und die Antikörper-vermittelten Färbungen für die Durchflusszytometrie wurden alle von derselben Person durchgeführt. Die verwendeten Färbungen umfassten etablierte Marker-Kombinationen, die bereits bei der Untersuchung anderer Erkrankungen Anwendung fanden (Wehr, Eibel et al. 2004, Blair, Norena et al. 2010, Juelke, Killig et al. 2010, Yin, Ma et al. 2010, Iwata, Matsushita et al. 2011, Ioannou, Alissafi et al. 2012, Irvine, Gallego et al. 2012, Flores-Borja, Bosma et al. 2013). Sie wurden in dieser Arbeit für eine effiziente Untersuchung vieler Zellpopulationen mit möglichst geringem Bedarf an Zellen zusammengestellt.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten erfolgte verblindet.

Schwächen der Arbeit liegen darin, dass in beiden Studien PBMC verwendet wurden, die in Flüssigstickstoff tiefgefroren waren. Bei den Einfrier- und Auftauprozessen sterben möglicherweise besonders stressempfindliche Zellen ab und ihre Häufigkeit im

peripheren Blut *in vivo* könnte in dieser Studie unterschätzt worden sein, z.B. bei Myeloiden Suppressorzellen (Trellakis, Bruderek et al. 2013).

Die TEENDIAB-Studie, aus der die Kinder ohne T1D stammten, erfasst Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern. Es wurden nur Probanden ausgewählt, die klinisch und laborchemisch keinen Diabetes aufwiesen (HbA1c, Nüchternblutglukose, C-Peptid unauffällig) und keine diabetestypischen Autoantikörper aufwiesen. Jedoch können mögliche Effekte einer genetischen Belastung nicht ausgeschlossen werden, die sich u.a. in Veränderungen der Anzahl von Immunzellen äußern kann (Irvine, Gallego et al. 2012).

Trotz der festgelegten Mindestanzahl von 500.000 PBMC für die Färbung von Monozyten waren bei einigen Proben nicht genug Monozyten vorhanden, um eine zuverlässige Analyse am Durchflusszytometer zu ermöglichen, was die Ausbeute an Daten schmälerte.

In nachfolgenden Untersuchungen sollte ein Bestätigungsansatz gewählt werden, der weniger verschiedene Zelltypen, diese aber gezielt untersucht. Studien zur genauen Charakterisierung der immunregulatorischen Funktion von transitionalen B-Lymphozyten bei Typ-1-Diabetikern erscheinen nötig.

6.2 Verminderung der transitionalen B-Lymphozyten bei Typ-1-Diabetikern

Die untersuchten Kinder mit neumanifestiertem T1D hatten im Mittel 27,3% weniger transitionale B-Lymphozyten (CD19+CD27-CD24hiCD38hi) im peripheren Blut als die Kontrollgruppe der Kinder ohne T1D. Diese Untergruppe regulatorischer B-Lymphozyten ist auch bei der rheumatoiden Arthritis und der Autoimmunthrombozytopenie als numerisch vermindert beschrieben worden. Im Gegensatz zu Patienten mit rheumatoider Arthritis mit Krankheitsaktivität (Flores-Borja, Bosma et al. 2013) war bei den Typ-1-Diabetikern in der vorliegenden Arbeit kein Verlust der Expression von CD24 auf transitionalen B-Lymphozyten zu beobachten. Stattdessen war die Population zahlenmäßig kleiner ohne den offensichtlichen Verlust der Expression der sie charakterisierenden Oberflächenmoleküle CD24 und CD38. Dies entspricht den

Veränderungen, die bei Patienten mit Autoimmunthrombozytopenie beobachtet wurden (Li, Zhong et al. 2012).

Bei den untersuchten Kindern mit T1D fiel keine signifikante Korrelation zwischen C-Peptid-Produktion im Nüchternzustand und der Anzahl transitionaler B-Lymphozyten oder eine negative Korrelation mit dem HbA1c auf. Jedoch können beide Werte nur begrenzt eine Aussage über das residuale Bestehen von Inselzellen geben und es können weitere Effekte, wie z.B. durch die schon begonnene Insulintherapie, nicht ausgeschlossen werden. Außerdem war die Stichprobengröße, mit der HbA1c und C-Peptid untersucht wurde, mit 36 bzw. 40 Kindern (Vgl. 5.5 Auswirkung der Anzahl der transitionalen B-Lymphozyten auf den Typ-1-Diabetes, und Abbildung 14, S.60) eventuell zu klein, um die Veränderungen zu detektieren.

Auch andere Arbeiten untersuchten das Auftreten von regulatorischen B-Lymphozyten beim T1D und kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen, wobei die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit in Frage zu stellen ist. *Thompson et al.* fanden keine statistisch signifikante Veränderung dieser Population bei Typ-1-Diabetikern im Vergleich mit Gesunden (Thompson, Pekalski et al. 2014). Dagegen beschrieben *Kleffel et al.* eine Verminderung von IL-10 produzierenden regulatorischen B-Lymphozyten bei Typ-1-Diabetikern, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (Kleffel, Vergani et al. 2015). Die Unterschiede könnten durch die Zusammensetzung der Probandenkollektive begründet sein. Während in dieser Studie ausschließlich Kinder mit neu manifestiertem T1D untersucht wurden (s. Tabelle 2, 37), waren die Kohorten bei *Thompson et al.* und *Kleffel et al.* heterogener. Beide untersuchten ein Patientenkollektiv, das einen im Mittel deutlich länger bestehenden T1D aufwies: Mediane Dauer des Diabetes 12 Monate bei einer Altersspanne von 9-34 Jahren in der Studie von *Thompson et al.*, 35 Jahre mittlere Diabetesdauer bei einem mittleren Alter von 53 Jahren in der Studie von *Kleffel et al.* Die vorliegende Arbeit untersuchte Patienten, bei denen ein Diabetes mellitus Typ 1 im Median 10 Tage zuvor erstmals diagnostiziert worden war bei einem Alter der untersuchten Kinder von 8,0 bis 14,8 Jahren. Auch bezüglich der Anzahl der Autoantikörper bei den Typ-1-Diabetikern unterscheiden sich die Studien: Die diabetischen Probanden in der Studie von *Thompson et al.* waren nicht alle für mindestens zwei diabetesspezifische Autoantikörper positiv, sondern teilweise nur für

einen. Die Studie von *Kleffel et al.* schloss wie diese Arbeit nur Typ-1-Diabetiker ein, die für mindestens zwei Autoantikörper positiv getestet waren. Die Anzahl dieser Autoantikörper reflektiert die Aggressivität des Autoimmunprozesses: Patienten mit mehreren Inselzell-Autoantikörpern schreiten schneller zum manifesten Diabetes mellitus voran und haben nach Behandlungsbeginn eine kürzere Phase mit reduziertem Insulinbedarf (Ziegler, Rewers et al. 2013). *Flores-Borja et al.* zeigten die stärkste Verminderung von transitionalen B-Lymphozyten bei der rheumatoiden Arthritis mit Krankheitsaktivität. Im entzündungsfreien Intervall ohne oder nur mit minimaler Krankheitsaktivität war die Verminderung von transitionalen B-Lymphozyten im Vergleich mit Gesunden schwächer ausgeprägt (Flores-Borja, Bosma et al. 2013).

Jedoch konnte eine relative Übereinstimmung mit *Thompson et al.* bezüglich der transitionalen B-Lymphozyten gefunden werden. In beiden Untersuchungen ließ sich beobachten, dass die Anzahl der transitionalen B-Lymphozyten im peripheren Blut mit dem Alter der untersuchten Probanden abnimmt. Dies steht auch im Konsens mit anderen Untersuchungen, die die transitionalen B-Lymphozyten ohne den Hintergrund einer Autoimmunerkrankung untersuchten und auch deren Abhängigkeit vom Alter der Probanden beobachteten (Dunn-Walters und Ademokun 2010, Morbach, Eichhorn et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Verminderung transistionaler B-Lymphozyten bei Typ-1-Diabetikern gefunden werden, was eine potentiell protektive Rolle der B-Lymphozyten abseits ihrer proinflammatorischen Funktionen zeigt. Eine Verminderung der absoluten IL-10-Konzentration im Serum bei Typ-1-Diabetikern wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Rapoport, Mor et al. 1998, Szelachowska, Kretowski et al. 1998). Da transitionale B-Lymphozyten ihre immunregulatorische Wirkung vornehmlich über IL-10 ausüben (Blair, Norena et al. 2010, Flores-Borja, Bosma et al. 2013), kann eine numerische Verminderung dieser Zellen als Ursache für die niedrigere IL-10-Produktion bei Typ-1-Diabetikern in Betracht gezogen werden. Besonders interessant ist das vermehrte Auftreten von transitionalen B-Lymphozyten nach Rituximab-induzierter B-Lymphozyten-Depletion, was als ursächlich für das temporäre Aufhalten des Autoimmunprozesses beim T1D diskutiert wurde (Palanichamy, Barnard et al. 2009, Pescovitz, Greenbaum et al. 2009). Die Vorstellung, dass nach

Depletion anfangs massenhaft transitionale B-Lymphozyten auftreten, die sich aber mit der Zeit zu reifen, nicht mehr immunregulatorisch wirksamen B-Lymphozyten entwickeln, würde das nur vorübergehende Stoppen des Autoimmunprozesses und nachfolgende Wiederauftreten erklären (Pescovitz, Greenbaum et al. 2009).

Die hier direkt bei Beginn der Erkrankung beobachtete Verminderung der transitionalen B-Lymphozyten passt in das Konzept der durch eine inflammatorische Umgebung ausgelösten schnellen Veränderung in der Anzahl von regulatorischen B-Lymphozyten (Rosser und Mauri 2015). Hier wird durch das kurze Bestehen des Diabetes die Rolle in der unmittelbaren Pathogenese unterstrichen, da Effekte durch langjährige Hyperglykämie noch nicht im Vordergrund stehen.

Das Feld der B-Lymphozyten mit immunregulatorischer Wirkung steht unter intensiver Forschung. Es wurden verschiedene Kombinationen von Oberflächenmarkern zu ihrer Definition und verschiedene Wirkungsweisen beschrieben (Yang, Rui et al. 2013, Mauri und Menon 2015, Rosser und Mauri 2015). Neben den transitionellen B-Lymphozyten wurden auch B10-Zellen als regulatorische B-Lymphozyten beschrieben. Diese waren jedoch in dieser Arbeit bei den Kindern mit T1D nicht signifikant verändert im Vergleich zu den Kindern ohne T1D. Weitere Arbeiten müssen die Zelltypen genauer beschreiben und versuchen, die verschiedenen Phänotypen in ein gemeinsames Modell zusammenzuführen. So könnten sich neue Ansatzpunkte bieten, gezielt über regulatorische B-Lymphozyten in die Pathogenese des T1D einzugreifen.

6.3 Keine Veränderung der CD21^{low} B-Lymphozyten bei Typ-1-Diabetikern

Die mittels CD21^{low} und der Aktivierungsmarker CD86, CD95, sowie IgD beschriebenen aktivierten B-Lymphozyten zeigten keine Vermehrung oder Überexpression der Marker bei den Kindern mit neu manifestiertem T1D. Dies steht im Gegensatz zu anderen systemischen Autoimmunerkrankungen oder Störungen des Immunsystems wie SLE, Granulomatose mit Polyangiitis oder dem Variablen Immundefektsyndrom (CVID). Beim CVID ist dieser Zelltyp massiv vermehrt, korreliert mit der Krankheitsaktivität und dient sogar als diagnostisches Kriterium in der Klinik (Bergbreiter und Salzer 2009). Dass sich im peripheren Blut keine Expansion dieses

Zelltypen finden lässt, kann ein Hinweis für die Organspezifität des T1D sein und ihn zu systemischen Autoimmunerkrankungen abgrenzen. Wenn CD21low B-Lymphozyten dennoch beim T1D eine Rolle spielen sollten, dann könnten sie lokalisiert im Pankreas selbst vermehrt sein, da sie sich spezifisch in entzündeten Geweben anreichern (Rakhmanov, Keller et al. 2009). Dies ist der Fall im bronchoalveolären Sekret bei COVID (Bergbreiter und Salzer 2009) oder im entzündeten Synovia bei rheumatoider Arthritis (Rakhmanov, Keller et al. 2009).

6.4 Keine Veränderung in der Monozytenverteilung bei Typ-1-Diabetikern

In der vorliegenden Untersuchung konnte die von *Irvine, Gallego et al.* vorgeschriebene Veränderung in der Zusammensetzung der Monozyten-Untergruppen nicht bestätigt werden (Irvine, Gallego et al. 2012).

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass *Irvine et al.* eine Veränderung der Monozyten-Untergruppen bereits bei Verwandten ersten Grades von Typ-1-Diabetikern nachweisen konnten. In der vorliegenden Arbeit dienten jedoch gesunde Verwandte ersten Grades von Typ-1-Diabetikern aus der TEENDIAB-Studie als Vergleichsgruppe. So war der Unterschied zwischen den Kindern mit T1D (DiMelli-Probanden) und den Kontrollen (TEENDIAB-Probanden) eventuell bereits kleiner als zu Probanden ohne T1D in der Familienanamnese und konnte im Rahmen dieser Studie nicht detektiert werden.

Üblicher als die Aufteilung der Monozyten in vier verschiedene Untergruppen ist die Aufteilung in drei Untergruppen, ohne die Gruppe der CD14lowCD16- (Ziegler-Heitbrock 2007, Ziegler-Heitbrock, Ancuta et al. 2010, Ziegler-Heitbrock 2014). Bei dieser Aufteilung ließen sich in einer anderen Studie ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Monozyten-Untergruppen bei Typ-1-Diabetikern finden (Bouma, Lam-Tse et al. 2004).

Zukünftige Experimente an Monozyten sollten angesichts ihrer geringen Anzahl im peripheren Blut am besten an frisch gewonnenen und nicht eingefrorenen PMBCs durchgeführt werden, um die Zellausbeute zu vergrößern.

6.5 Keine Veränderung der Expression von Siglec-1 auf Monozyten bei Typ-1-Diabetikern

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Siglec-1 exprimierenden Monozyten im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und den gesunden Kontrollen. Es wurde eine große Streubreite in der Siglec-1-Expression in beiden Kohorten nachgewiesen. Die Varianzen zwischen beiden Kohorten sind jedoch nicht signifikant verschieden ($p=0,446$). Dies kann durch dadurch begründet sein, dass gerade keine Expression der INF-Signatur mit Siglec-1-Expression (mehr) in der DiMelli-Kohorte stattfindet. *Ferreira et al.* zeigten, dass die Expression der IFN-Signatur nur transient nachweisbar war, beispielsweise bei einer Influenza-Impfung nur etwa drei Tage lang. Bei bereits manifesten Diabetikern war eine deutlich geringere Expression als bei Kindern kurz vor der Serokonversion nachweisbar (Ferreira, Guo et al. 2014). Die in der DiMelli-Studie befindlichen Kinder haben bereits einen manifesten Diabetes mit Autoantikörpern, eine Serokonversion hat also schon stattgefunden. Selbst die kurze Zeit zwischen Diagnose und Gewinnung der PBMC für die DiMelli-Studie (hier im Median 10 Tage) war demnach nicht mehr ausreichend, die INF-Signatur bzw. die veränderte Expression von Siglec-1 auf CD14+ Monozyten abzubilden. Dies unterstreicht die zeitliche Zuordnung des Auftretens der IFN-Signatur vor dem Auftreten von Inselzell-Autoantikörpern (Ferreira, Guo et al. 2014).

Ebenso ist es möglich, dass die IFN-Signatur auch schon bei kleineren Infekten exprimiert wird. Es wurden zwar im Vorfeld alle Probanden ausgeschlossen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme subjektiv krank waren, jedoch wurden keine laborchemischen Entzündungsmarker wie C-reaktives Protein oder Leukozytenanzahl bestimmt.

6.6 Keine Veränderung der Myeloiden Suppressorzellen bei Typ-1-Diabetikern

Es finden sich keine Unterschiede in der Anzahl der granulozytären Myeloiden Suppressorzellen zwischen den beiden Kohorten.

Es wurde für diese Arbeit die Charakterisierung der MDSC von *Ioannou et al.* mit der Markerkombination *HLA-DR⁻/lowCD14⁻CD33⁺CD15⁺* gewählt. Dieser Phänotyp entspricht der Untergruppe der Myeloiden Suppressorzellen vom granulozytären Typ (Ioannou, Alissafi et al. 2012). Die bekannte Heterogenität der Zellpopulation (Youn, Nagaraj et al. 2008, Gabrilovich und Nagaraj 2009, Youn, Collazo et al. 2012) der MDSC schließt nicht aus, dass ein anderer Typ von MDSC beim T1D eine Rolle spielen könnte. In der Tat wurde eine Vermehrung Myeloider Suppressorzellen vom monozytischen Typ (charakterisiert durch die Marker CD11b und CD33) bei Typ-1-Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen in einer Studie beschrieben (Whitfield-Larry, Felton et al. 2014).

Im Zusammenhang mit dem *Tumorenvironment* wurde beobachtet, dass bei Tumoren unterschiedlicher Gewebe unterschiedliche Phänotypen von MDSC expandieren (Jiang, Guo et al. 2014, Solito, Marigo et al. 2014, Bronte, Brandau et al. 2016). Für Autoimmunerkrankungen ist ein ähnliches Verhalten denkbar, d.h. dass in Abhängigkeit der Autoimmunerkrankung unterschiedliche Typen von MDSC expandieren (Boros, Ochando et al. 2016).

6.7 Keine veränderte Rezeptor-Expression auf natürlichen Killerzellen bei Typ-1-Diabetikern

Die untersuchten NK-Zell-Rezeptoren waren zwischen DiMelli und TEENDIAB nicht verschieden exprimiert. Es könnten schlicht andere, nicht untersuchte Rezeptoren die Aktivierung der NK-Zellen beim T1D widerspiegeln bzw. ihre Infiltration in das Pankreas ermöglichen. Eine andere Möglichkeit wäre die lokale Störung in den Langerhans-Inseln im Rahmen der Insulinitis, die die Infiltration der NK-Zellen zulässt, die dann z.B. mittels NKp46 an der Zerstörung der Betazellen mitwirken (Gur, Enk et al. 2011). Eine derartige Veränderung ließe sich im peripheren Blut nicht beobachten.

Der durch Coxsackie-B4-Virus ausgelöste T1D stellt möglicherweise eine Sonderform dar. Eine Zerstörung der viral infizierten Betazellen durch NK-Zellen erscheint durch theoretische immunologische Überlegungen (vgl. 3.3 Natürliche Killerzellen, S.22) möglich. Jedoch könnte die Prävalenz der Coxsackie-B4-Virus vermittelten Immunreaktion als Auslöser von T1D in der Arbeit von *Dotta et al.* aufgrund der kleinen Stichprobe von sieben Probanden zufällig überschätzt worden sein (Dotta, Censini et al.

2007). So könnten bei den hier untersuchten Typ-1-Diabetikern wenige oder keine Coxsackie-B4-Virus-Infektionen für die Krankheitsentstehung verantwortlich gewesen sein.

Die hier gemachten Beobachtungen stützen die Vermutung, dass NK-Zellen keine tragende Rolle in der Entwicklung des T1D spielen, wie auch *Willcox et al.* annahmen (Willcox, Richardson et al. 2009). Zukünftige Untersuchungen an NK-Zellen sollten vornehmlich ihre Wechselwirkung mit anderen Immunzellen bei der Pathogenese beleuchten, z.B. mittels Zytokinsekretion (Lehuen, Diana et al. 2010). Die Identifikation des auf Betazellen gebundenen Liganden von NKp46 und des Mechanismus, wie NK-Zellen beim T1D das Pankreas infiltrieren können, sind mit großem Aufwand verbunden (Mandelboim und Enk 2014), aber ermöglichen, die potentielle direkte Wirkung von NK-Zellen auf Betazellen zu erforschen.

7 Zusammenfassung

Der Typ-1-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, die gekennzeichnet ist durch die Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen im Pankreas durch T-Lymphozyten. Es wurde jedoch gezeigt, dass andere Immunzellen an der Pathogenese beteiligt sind oder sie pathogene T-Lymphozyten auf verschiedene Arten beeinflussen können. Zu diesen Zellen gehören vor allem B-Lymphozyten, aber auch Natürliche Killerzellen und Monozyten. Es wurden in den letzten Jahren Untergruppen von B-Lymphozyten mit pro- und antiinflammatorischen Wirkungen beschrieben, die bei anderen Autoimmunerkrankungen die Pathogenese beeinflussen, die aber beim Typ-1-Diabetes bisher nicht oder nur in wenigen Studien untersucht wurden. Ebenso wenig ist die Rolle von anderen regulatorischen Immunzellen, wie etwa Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) oder die Expression von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf NK-Zellen beim Typ-1-Diabetes zufriedenstellend untersucht.

Diese Arbeit untersuchte diese wenig beachteten „Akteure“ in der zellulären Pathogenese des Typ-1-Diabetes am Menschen, nämlich proinflammatorische CD21^{low} B-Lymphozyten, antiinflammatorische transitionale B-Lymphozyten, NK-Zellen, MDSC und Monozyten, auf numerische Unterschiede zwischen Kindern mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes und gleichaltrigen Kindern ohne Diabetes.

Dazu wurden mononukleare Zellen des peripheren Blutes von Kindern mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes und multiplen Autoantikörpern (aus der DiMelli-Kohorte des Instituts für Diabetesforschung) mit denen von gleichaltrigen Kindern ohne Diabetes (aus der TEENDIAB-Kohorte des Instituts für Diabetesforschung) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es wurde mittels zweiseitigem t-Test bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ (bzw. $\alpha^*=2,38 \times 10^{-3}$ nach Bonferroni-Korrektur) auf Unterschiede zwischen beiden Gruppen getestet.

Dabei zeigten sich die folgenden Ergebnisse:

- 1) Die immunsuppressiven transitionalen B-Lymphozyten (CD19⁺CD27⁻CD24^{hi}CD38^{hi}) kamen bei Kindern mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes signifikant seltener vor als bei Kindern ohne Diabetes ($6,436 \pm 0,56\%$ der B-

Lymphozyten $n=42$; $8,86\pm 0,53\%$ der B-Lymphozyten, $n=48$; t-Test: $p=2,10\times 10^{-3}$). Die übrige Untersuchung des B-Lymphozyten-Kompartiments ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die untersuchten Ausreifungsstufen von B-Lymphozyten (Plasmablasten ($p=0,883$), IgD+IgM+ ($p=0,381$)) und auch die andere immunregulatorische Untergruppe der B10 ($p=0,607$) waren bei den Kindern mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes gegenüber den Kindern ohne Diabetes zahlenmäßig nicht verändert. Die B-Lymphozyten der Kinder mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes waren nicht verstärkt aktiviert. Die proinflammatorischen CD21low B-Lymphozyten waren in beiden Kohorten gleich häufig vertreten ($10,55\pm 0,76\%$, $9,631\pm 0,50\%$; $p=0,296$), auch deren Expression von IgD ($p=0,758$) und der Aktivierungsmarker CD86 ($p=0,510$) und CD95 ($p=0,466$) war in beiden Kohorten gleich stark.

- 2) Die NK-Zellen zeigten sich sowohl numerisch als auch in Bezug auf die Expression der untersuchten Oberflächenmarker in beiden Kohorten gleich. Getestet wurden die inhibitorischen Marker CD94 ($p=0,656$) und CD161 ($p=0,186$), sowie die proinflammatorischen Marker CD117 ($p=0,279$), CD197 ($p=0,168$), CD62L ($p=0,168$), CD314 ($p=0,545$), CD122 ($p=0,555$) und CD69 ($p=0,014$).
- 3) Siglec-1 auf Monozyten als Marker einer Expression von IFN- α -induzierbaren Genen war in den beiden Gruppen nicht unterschiedlich exprimiert ($p=0,887$). Der Anteil der Siglec-1+ Monozyten an den gesamten Monozyten unterlag einer großen interindividuellen Streuung, jedoch waren die Varianzen in der Siglec-1-Expression bei Kindern mit Typ-1-Diabetes nicht signifikant verschieden von der nicht-diabetischer Kinder ($p=0,446$). Es zeigten sich keine numerischen Veränderungen in den Monozyten-Untergruppen CD14highCD16+ ($p=0,246$), CD14highCD16- ($p=0,388$), CD14lowCD16+ ($p=0,647$) und CD14lowCD16- ($p=0,124$) zwischen Kindern mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes und Kindern ohne Diabetes.
- 4) MDSC kamen bei Kindern mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes gleich häufig vor wie bei Kindern ohne Diabetes ($p=0,241$).

Zusammenfassend kann die Beteiligung von B-Lymphozyten an der Pathogenese des Typ-1-Diabetes unterstrichen werden. Die Verminderung der transitionalen B-Lymphozyten, die vor allem über die Ausschüttung des Zytokins IL-10 immunregulatorisch wirken, fügt sich in das Bild der bereits im Serum nachgewiesenen Minderproduktion von IL-10 bei Typ-1-Diabetikern ein. Es fehlen noch weitere Arbeiten zum Phänotyp und zur Funktion dieses Zelltyps, beispielsweise durch intrazelluläre Färbung von IL-10, um die Rollen, die B-Lymphozyten neben der Produktion von Autoantikörpern und der Antigenpräsentation beim Typ-1-Diabetes spielen, detaillierter verstehen zu können.

8 Literaturverzeichnis

- Agematsu, K., S. Hokibara, H. Nagumo and A. Komiyama (2000). "CD27: a memory B-cell marker." Immunol Today **21**(5): 204-206.
- Aldemir, H., V. Prod'homme, M. J. Dumaurier, C. Retiere, G. Poupon, J. Cazareth, F. Bihl and V. M. Braud (2005). "Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor." J Immunol **175**(12): 7791-7795.
- Arce, E., D. G. Jackson, M. A. Gill, L. B. Bennett, J. Banchereau and V. Pascual (2001). "Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus." J Immunol **167**(4): 2361-2369.
- Barrett, J. C., D. G. Clayton, P. Concannon, B. Akolkar, J. D. Cooper, H. A. Erlich, C. Julier, G. Morahan, J. Nerup, C. Nierras, V. Plagnol, F. Pociot, H. Schuilenburg, D. J. Smyth, H. Stevens, J. A. Todd, N. M. Walker and S. S. Rich (2009). "Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes." Nat Genet **41**(6): 703-707.
- Bergbreiter, A. and U. Salzer (2009). "Common variable immunodeficiency: a multifaceted and puzzling disorder." Expert Rev Clin Immunol **5**(2): 167-180.
- Beyerlein, A., F. Wehweck, A. G. Ziegler and M. Pflueger (2013). "Respiratory infections in early life and the development of islet autoimmunity in children at increased type 1 diabetes risk: evidence from the BABYDIET study." JAMA Pediatr **167**(9): 800-807.
- Bijl, M., G. Horst, P. C. Limburg and C. G. Kallenberg (2001). "Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis **60**(5): 523-526.
- Bingley, P. J. (2010). "Clinical applications of diabetes antibody testing." J Clin Endocrinol Metab **95**(1): 25-33.
- Blair, P. A., L. Y. Norena, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2010). "CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients." Immunity **32**(1): 129-140.
- Bonifacio, E., V. Lampasona, S. Genovese, M. Ferrari and E. Bosi (1995). "Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies." J Immunol **155**(11): 5419-5426.
- Bonifacio, E., M. Scirpoli, K. Kredel, M. Fuchtenbusch and A. G. Ziegler (1999). "Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation." J Immunol **163**(1): 525-532.
- Boros, P., J. Ochando and M. Zeher "Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity." Hum Immunol. 2016 Aug;77(8):631-636.
- Bouma, G., W. K. Lam-Tse, A. F. Wierenga-Wolf, H. A. Drexhage and M. A. Versnel (2004). "Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of

CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin." Diabetes **53**(8): 1979-1986.

Brauner, H., M. Elemans, S. Lemos, C. Broberger, D. Holmberg, M. Flodstrom-Tullberg, K. Karre and P. Hoglund (2010). "Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice." J Immunol **184**(5): 2272-2280.

Bronte, V., S. Brandau, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. B. Frey, T. F. Greten, S. Mandruzzato, P. J. Murray, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, P. C. Rodriguez, A. Sica, V. Umansky, R. H. Vonderheide and D. I. Gabrilovich (2016). "Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards." Nat Commun **7**: 12150.

Burkhardt, J. K., S. Hester, C. K. Lapham and Y. Argon (1990). "The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments." J Cell Biol **111**(6 Pt 1): 2327-2340.

Carson, W. E., S. Haldar, R. A. Baiocchi, C. M. Croce and M. A. Caligiuri (1994). "The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7553-7557.

Chan, A., D. L. Hong, A. Atzberger, S. Kollnberger, A. D. Filer, C. D. Buckley, A. McMichael, T. Enver and P. Bowness (2007). "CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts." J Immunol **179**(1): 89-94.

Cheung, N., P. Mitchell and T. Y. Wong (2010). "Diabetic retinopathy." Lancet **376**(9735): 124-136.

Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson and M. A. Caligiuri (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." Blood **97**(10): 3146-3151.

Couper, K. N., D. G. Blount and E. M. Riley (2008). "IL-10: the master regulator of immunity to infection." J Immunol **180**(9): 5771-5777.

Crook, K. R. and P. Liu (2014). "Role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune disease." World J Immunol **4**(1): 26-33.

Danis, V., M. Millington, V. Hyland and D. Grennan (1995). "Cytokine production by normal human monocytes: inter - subject variation and relationship to an IL - 1 receptor antagonist (IL - 1Ra) gene polymorphism." Clinical & Experimental Immunology **99**(2): 303-310.

Danne, T. und A. Neu (2012). "Diabetes bei Kindern und Jugendlichen." Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2012: 105-113, Kirchheim-Verlag.

de Matos, C. T., L. Berg, J. Michaelsson, L. Fellander-Tsai, K. Karre and K. Soderstrom (2007). "Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion." Immunology **122**(2): 291-301.

Dorner, T., A. M. Jacobi, J. Lee and P. E. Lipsky (2011). "Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus." J Immunol Methods **363**(2): 187-197.

Dotta, F., S. Censini, A. G. van Halteren, L. Marselli, M. Masini, S. Dionisi, F. Mosca, U. Boggi, A. O. Muda, S. Del Prato, J. F. Elliott, A. Covacci, R. Rappuoli, B. O. Roep and P. Marchetti (2007).

"Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 5115-5120.

Dunn-Walters, D. K. and A. A. Ademokun (2010). "B cell repertoire and ageing." Current Opinion in Immunology **22**(4): 514-520.

Ehehalt, S., K. Dietz, A. M. Willasch and A. Neu (2010). "Epidemiological perspectives on type 1 diabetes in childhood and adolescence in Germany: 20 years of the Baden-wuerttemberg Diabetes Incidence Registry (DIARY)." Diabetes Care **33**(2): 338-340.

Eizirik, D. L., M. L. Colli and F. Ortis (2009). "The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes." Nat Rev Endocrinol **5**(4): 219-226.

ElEssawy, B. and X. C. Li (2015). "Type 1 diabetes and T regulatory cells." Pharmacol Res **98**: 22-30.

Ferlazzo, G., D. Thomas, S. L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W. A. Muller, A. Moretta and C. Munz (2004). "The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic." J Immunol **172**(3): 1455-1462.

Ferreira, R. C., H. Guo, R. M. Coulson, D. J. Smyth, M. L. Pekalski, O. S. Burren, A. J. Cutler, J. D. Doecke, S. Flint, E. F. McKinney, P. A. Lyons, K. G. Smith, P. Achenbach, A. Beyerlein, D. B. Dunger, D. G. Clayton, L. S. Wicker, J. A. Todd, E. Bonifacio, C. Wallace and A. G. Ziegler (2014). "A type I interferon transcriptional signature precedes autoimmunity in children genetically at risk for type 1 diabetes." Diabetes **63**(7): 2538-2550.

Ferrero, E. and F. Malavasi (1999). "The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38." J Leukoc Biol **65**(2): 151-161.

Feuerer, M., Y. Shen, D. R. Littman, C. Benoist and D. Mathis (2009). "How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets." Immunity **31**(4): 654-664.

Fink, K. (2012). "Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections." Front Immunol **3**: 78.

Fiorina, P., A. Vergani, S. Dada, M. Jurewicz, M. Wong, K. Law, E. Wu, Z. Tian, R. Abdi, I. Guleria, S. Rodig, K. Dunussi-Joannopoulos, J. Bluestone and M. H. Sayegh (2008). "Targeting CD22 reprograms B-cells and reverses autoimmune diabetes." Diabetes **57**(11): 3013-3024.

Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. R. Ehrenstein, D. A. Isenberg and C. Mauri (2013). "CD19+CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation." Sci Transl Med **5**(173): 173ra123.

Fuller, J. H., M. J. Shipley, G. Rose, R. J. Jarrett and H. Keen (1980). "Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study." Lancet **1**(8183): 1373-1376.

Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-174.

Goni, O., P. Alcaide and M. Fresno (2002). "Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells." Int Immunol **14**(10): 1125-1134.

- Grubin, C. E., T. Daniels, B. Toivola, M. Landin-Olsson, W. A. Hagopian, L. Li, A. E. Karlsen, E. Boel, B. Michelsen and A. Lernmark (1994). "A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM." Diabetologia **37**(4): 344-350.
- Gur, C., J. Enk, S. A. Kassem, Y. Suissa, J. Magenheimer, M. Stolovich-Rain, T. Nir, H. Achdout, B. Glaser, J. Shapiro, Y. Naparstek, A. Porgador, Y. Dor and O. Mandelboim (2011). "Recognition and killing of human and murine pancreatic beta cells by the NK receptor NKp46." J Immunol **187**(6): 3096-3103.
- Gur, C., A. Porgador, M. Elboim, R. Gazit, S. Mizrahi, N. Stern-Ginossar, H. Achdout, H. Ghadially, Y. Dor, T. Nir, V. Doviner, O. Hershkovitz, M. Mendelson, Y. Naparstek and O. Mandelboim (2010). "The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes." Nat Immunol **11**(2): 121-128.
- Hathcock, K. S. and R. J. Hodes (1996). "Role of the CD28-B7 costimulatory pathways in T cell-dependent B cell responses." Adv Immunol **62**: 131-166.
- Hu, C. Y., D. Rodriguez-Pinto, W. Du, A. Ahuja, O. Henegariu, F. S. Wong, M. J. Shlomchik and L. Wen (2007). "Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice." J Clin Invest **117**(12): 3857-3867.
- Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino and S. H. Chen (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." Cancer Res **66**(2): 1123-1131.
- In't Veld, P., D. Lievens, J. De Grijse, Z. Ling, B. Van der Auwera, M. Pipeleers-Marichal, F. Gorus and D. Pipeleers (2007). "Screening for insulinitis in adult autoantibody-positive organ donors." Diabetes **56**(9): 2400-2404.
- Ioannou, M., T. Alissafi, I. Lazaridis, G. Deraos, J. Matsoukas, A. Gravanis, V. Mastorodemos, A. Plaitakis, A. Sharpe, D. Boumpas and P. Verginis (2012). "Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease." J Immunol **188**(3): 1136-1146.
- Irvine, K. M., P. Gallego, X. An, S. E. Best, G. Thomas, C. Wells, M. Harris, A. Cotterill and R. Thomas (2012). "Peripheral blood monocyte gene expression profile clinically stratifies patients with recent-onset type 1 diabetes." Diabetes **61**(5): 1281-1290.
- Italiani, P. and D. Boraschi (2014). "From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation." Front Immunol **5**: 514.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair and T. F. Tedder (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." Blood **117**(2): 530-541.
- Jacobi, A. M., H. Mei, B. F. Hoyer, I. M. Mumtaz, K. Thiele, A. Radbruch, G. R. Burmester, F. Hiepe and T. Dorner (2010). "HLA-DRhigh/CD27high plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis **69**(1): 305-308.

- Jacobi, A. M., J. Zhang, M. Mackay, C. Aranow and B. Diamond (2009). "Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus." PLoS One **4**(6): e5776.
- Jenkins, S. J. and D. A. Hume (2014). "Homeostasis in the mononuclear phagocyte system." Trends Immunol **35**(8): 358-367.
- Jiang, J., W. Guo and X. Liang (2014). "Phenotypes, accumulation, and functions of myeloid-derived suppressor cells and associated treatment strategies in cancer patients." Hum Immunol **75**(11): 1128-1137.
- Juelke, K., M. Killig, M. Luetke-Eversloh, E. Parente, J. Gruen, B. Morandi, G. Ferlazzo, A. Thiel, I. Schmitt-Knosalla and C. Romagnani (2010). "CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells." Blood **116**(8): 1299-1307.
- Karre, K. (2002). "NK cells, MHC class I molecules and the missing self." Scand J Immunol **55**(3): 221-228.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek and R. Kiessling (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." Nature **319**(6055): 675-678.
- Karvonen, M., M. Viik-Kajander, E. Moltchanova, I. Libman, R. LaPorte and J. Tuomilehto (2000). "Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group." Diabetes Care **23**(10): 1516-1526.
- Kleffel, S., A. Vergani, S. Tezza, M. Ben Nasr, M. A. Niewczasz, S. Wong, R. Bassi, F. D'Addio, T. Schatton, R. Abdi, M. Atkinson, M. H. Sayegh, L. Wen, C. H. Wasserfall, K. C. O'Connor and P. Fiorina (2014). "Interleukin-10+ Regulatory B Cells Arise Within Antigen-Experienced CD40+ B Cells to Maintain Tolerance to Islet Autoantigens." Diabetes.
- Kleffel, S., A. Vergani, S. Tezza, M. Ben Nasr, M. A. Niewczasz, S. Wong, R. Bassi, F. D'Addio, T. Schatton, R. Abdi, M. Atkinson, M. H. Sayegh, L. Wen, C. H. Wasserfall, K. C. O'Connor and P. Fiorina (2015). "Interleukin-10+ regulatory B cells arise within antigen-experienced CD40+ B cells to maintain tolerance to islet autoantigens." Diabetes **64**(1): 158-171.
- Konjevic, G., K. Mirjagic Martinovic, A. Vuletic, V. Jurisic and I. Spuzic (2009). "Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals." J Membr Biol **230**(3): 113-123.
- Kos, F. J. and E. G. Engleman (1996). "Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs." Immunology Today **17**(4): 174-176.
- Kos, J., M. Perišić Nanut, J. Sabotic and A. Jewett (2014). "Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells." Frontiers in Immunology **5**.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-795.
- Kusmartsev, S., Y. Nefedova, D. Yoder and D. I. Gabrilovich (2004). "Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species." J Immunol **172**(2): 989-999.

- Lehuen, A., J. Diana, P. Zaccane and A. Cooke (2010). "Immune cell crosstalk in type 1 diabetes." Nat Rev Immunol **10**(7): 501-513.
- Li, X., H. Zhong, W. Bao, N. Boulad, J. Evangelista, M. A. Haider, J. Bussel and K. Yazdanbakhsh (2012). "Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia." Blood **120**(16): 3318-3325.
- Luetke-Eversloh, M., M. Killig and C. Romagnani (2013). "Signatures of human NK cell development and terminal differentiation." Front Immunol **4**: 499.
- Maloney, D. G. (2012). "Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas." N Engl J Med **366**(21): 2008-2016.
- Mandelboim, O. and J. Enk (2014). "The role of natural cytotoxicity receptors in various pathologies: Emphasis on Type I diabetes." Frontiers in Immunology **5**.
- Mauri, C. (2010). "Regulation of immunity and autoimmunity by B cells." Curr Opin Immunol **22**(6): 761-767.
- Mauri, C. and P. A. Blair (2010). "Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies." Nat Rev Rheumatol **6**(11): 636-643.
- Mauri, C. and M. Menon (2015). "The expanding family of regulatory B cells." Int Immunol.
- Mellerio, H., S. Guilmin-Crepon, P. Jacquin, M. Labeguerie, C. Levy-Marchal and C. Alberti (2015). "Long-term impact of childhood-onset type 1 diabetes on social life, quality of life and sexuality." Diabetes Metab.
- Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki and T. Taniguchi (1993). "The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes." Annu Rev Immunol **11**: 245-268.
- Mohan, C., L. Morel, P. Yang and E. K. Wakeland (1997). "Genetic dissection of systemic lupus erythematosus pathogenesis: Sle2 on murine chromosome 4 leads to B cell hyperactivity." J Immunol **159**(1): 454-465.
- Morbach, H., E. M. Eichhorn, J. G. Liese and H. J. Girschick (2010). "Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood." Clin Exp Immunol **162**(2): 271-279.
- Movahedi, K., M. Guilliams, J. Van den Bossche, R. Van den Bergh, C. Gysemans, A. Beschin, P. De Baetselier and J. A. Van Ginderachter (2008). "Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity." Blood **111**(8): 4233-4244.
- Murphy, K. M., P. Travers and M. Walport (2009). Janeway Immunologie. Heidelberg, Springer Spektrum.
- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." Science **267**(5203): 1449-1456.
- Newell, K. A., A. Asare, A. D. Kirk, T. D. Gisler, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W. J. Burlingham, W. H. Marks, I. Sanz, R. I. Lechler, M. P. Hernandez-Fuentes, L. A. Turka and V. L. Seyfert-Margolis (2010). "Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1836-1847.

Odendahl, M., A. Jacobi, A. Hansen, E. Feist, F. Hiepe, G. R. Burmester, P. E. Lipsky, A. Radbruch and T. Dorner (2000). "Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus." J Immunol **165**(10): 5970-5979.

Ogasawara, K., J. A. Hamerman, H. Hsin, S. Chikuma, H. Bour-Jordan, T. Chen, T. Pertel, C. Carnaud, J. A. Bluestone and L. L. Lanier (2003). "Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice." Immunity **18**(1): 41-51.

Ost, M., A. Singh, A. Peschel, R. Mehling, N. Rieber and D. Hartl (2016). "Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections." Front Cell Infect Microbiol **6**: 37.

Osterby, R., A. Hartmann and H. J. Bangstad (2002). "Structural changes in renal arterioles in Type I diabetic patients." Diabetologia **45**(4): 542-549.

Palanichamy, A., J. Barnard, B. Zheng, T. Owen, T. Quach, C. Wei, R. J. Looney, I. Sanz and J. H. Anolik (2009). "Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy." J Immunol **182**(10): 5982-5993.

Passlick, B., D. Flieger and H. W. Ziegler-Heitbrock (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." Blood **74**(7): 2527-2534.

Patterson, C. C., E. Gyurus, J. Rosenbauer, O. Cinek, A. Neu, E. Schober, R. C. Parslow, G. Joner, J. Svensson, C. Castell, P. J. Bingley, E. Schoenle, P. Jarosz-Chobot, B. Urbonaite, U. Rothe, C. Krzisnik, C. Ionescu-Tirgoviste, I. Weets, M. Kocova, G. Stipancic, M. Samardzic, C. E. de Beaufort, A. Green, G. G. Dahlquist and G. Soltesz (2012). "Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase." Diabetologia **55**(8): 2142-2147.

Perussia, B. (1998). "Fc receptors on natural killer cells." Curr Top Microbiol Immunol **230**: 63-88.

Pescovitz, M. D., C. J. Greenbaum, B. Bundy, D. J. Becker, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, J. B. Marks, A. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, D. A. Schatz, D. K. Wherrett, D. M. Wilson, J. P. Krischer and J. S. Skyler (2014). "B-lymphocyte depletion with rituximab and beta-cell function: two-year results." Diabetes Care **37**(2): 453-459.

Pescovitz, M. D., C. J. Greenbaum, H. Krause-Steinrauf, D. J. Becker, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, J. B. Marks, P. F. McGee, A. M. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, D. A. Schatz, D. Wherrett, D. M. Wilson, J. M. Lachin and J. S. Skyler (2009). "Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function." N Engl J Med **361**(22): 2143-2152.

Phillips, J. M., N. M. Parish, T. Raine, C. Bland, Y. Sawyer, H. De La Pena and A. Cooke (2009). "Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations." Rev Diabet Stud **6**(2): 97-103.

Pradier, A., S. Tabone-Eglinger, V. Huber, C. Bosshard, E. Rigal, B. Wehrle-Haller and E. Roosnek (2014). "Peripheral blood CD56(bright) NK cells respond to stem cell factor and adhere to its membrane-bound form after upregulation of c-kit." Eur J Immunol **44**(2): 511-520.

Rakhmanov, M., B. Keller, S. Gutenberger, C. Foerster, M. Hoenig, G. Driessen, M. van der Burg, J. J. van Dongen, E. Wiech, M. Visentini, I. Quinti, A. Prasse, N. Voelxen, U. Salzer, S. Goldacker, P. Fisch, H. Eibel, K. Schwarz, H. H. Peter and K. Warnatz (2009). "Circulating

CD21^{low} B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13451-13456.

Rapoport, M. J., A. Mor, P. Vardi, Y. Ramot, R. Winker, A. Hindi and T. Bistrizter (1998). "Decreased secretion of Th2 cytokines precedes Up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus." J Autoimmun **11**(6): 635-642.

Rodacki, M., B. Svoren, V. Butty, W. Besse, L. Laffel, C. Benoist and D. Mathis (2007). "Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients." Diabetes **56**(1): 177-185.

Rodriguez, P. C., C. P. Hernandez, D. Quiceno, S. M. Dubinett, J. Zabaleta, J. B. Ochoa, J. Gilbert and A. C. Ochoa (2005). "Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma." J Exp Med **202**(7): 931-939.

Rodriguez, P. C., A. H. Zea, K. S. Culotta, J. Zabaleta, J. B. Ochoa and A. C. Ochoa (2002). "Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine." J Biol Chem **277**(24): 21123-21129.

Rogacev, K. S., S. Seiler, A. M. Zawada, B. Reichart, E. Herath, D. Roth, C. Ulrich, D. Fliser and G. H. Heine (2011). "CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease." Eur Heart J **32**(1): 84-92.

Romagnani, C., K. Juelke, M. Falco, B. Morandi, A. D'Agostino, R. Costa, G. Ratto, G. Forte, P. Carrega, G. Lui, R. Conte, T. Strowig, A. Moretta, C. Munz, A. Thiel, L. Moretta and G. Ferlazzo (2007). "CD56^{bright}CD16⁻ killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56^{dim} NK cells upon activation." J Immunol **178**(8): 4947-4955.

Rosen, D. B., J. Bettadapura, M. Alsharifi, P. A. Mathew, H. S. Warren and L. L. Lanier (2005). "Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor." J Immunol **175**(12): 7796-7799.

Rosser, E. C. and C. Mauri (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function." Immunity **42**(4): 607-612.

Russell, J. H. and T. J. Ley (2002). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **20**: 323-370.

Saisho, Y. (2016). "Postprandial C-Peptide to Glucose Ratio as a Marker of β Cell Function: Implication for the Management of Type 2 Diabetes." Int J Mol Sci **17**(5).

Sibley, R. K., D. E. Sutherland, F. Goetz and A. F. Michael (1985). "Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases." Lab Invest **53**(2): 132-144.

Silveira, P. A., E. Johnson, H. D. Chapman, T. Bui, R. M. Tisch and D. V. Serreze (2002). "The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors." Eur J Immunol **32**(12): 3657-3666.

Sims, G. P., R. Ettinger, Y. Shirota, C. H. Yarboro, G. G. Illei and P. E. Lipsky (2005). "Identification and characterization of circulating human transitional B cells." Blood **105**(11): 4390-4398.

- Sinha, P., V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda and S. Ostrand-Rosenberg (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." J Immunol **179**(2): 977-983.
- Smith, A. R. and J. M. Reynolds (2014). "Editorial: the contribution of myeloid-derived suppression to inflammatory disease." J Leukoc Biol **96**(3): 361-364.
- Solana, R., C. Campos, A. Pera and R. Tarazona (2014). "Shaping of NK cell subsets by aging." Curr Opin Immunol **29c**: 56-61.
- Solito, S., I. Marigo, L. Pinton, V. Damuzzo, S. Mandruzzato and V. Bronte (2014). "Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers." Ann N Y Acad Sci **1319**: 47-65.
- Szakonyi, G., J. M. Guthridge, D. Li, K. Young, V. M. Holers and X. S. Chen (2001). "Structure of complement receptor 2 in complex with its C3d ligand." Science **292**(5522): 1725-1728.
- Szelachowska, M., A. Kretowski and I. Kinalska (1998). "Decreased in vitro IL-4 [corrected] and IL-10 production by peripheral blood in first degree relatives at high risk of diabetes type-I." Horm Metab Res **30**(8): 526-530.
- Tedder, T. F., L.-J. Zhou and P. Engel (1994). "The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes." Immunology Today **15**(9): 437-442.
- Terabe, M., S. Matsui, J. M. Park, M. Mamura, N. Noben-Trauth, D. D. Donaldson, W. Chen, S. M. Wahl, S. Ledbetter, B. Pratt, J. J. Letterio, W. E. Paul and J. A. Berzofsky (2003). "Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence." J Exp Med **198**(11): 1741-1752.
- Thompson, W. S., M. L. Pekalski, H. Z. Simons, D. J. Smyth, X. Castro-Dopico, H. Guo, C. Guy, D. B. Dunger, S. Arif, M. Peakman, C. Wallace, L. S. Wicker, J. A. Todd and R. C. Ferreira (2014). "Multi-parametric flow cytometric and genetic investigation of the peripheral B cell compartment in human type 1 diabetes." Clin Exp Immunol **177**(3): 571-585.
- Thorarinsdottir, K., A. Camponeschi, I. Gjertsson and I. L. Martensson (2015). "CD21(-/low) B cells: A Snapshot of a Unique B Cell Subset in Health and Disease." Scand J Immunol **82**(3): 254-261.
- Thumer, L., K. Adler, E. Bonifacio, F. Hofmann, M. Keller, C. Milz, A. Munte and A. G. Ziegler (2010). "German new onset diabetes in the young incident cohort study: DiMelli study design and first-year results." Rev Diabet Stud **7**(3): 202-208.
- Todd, J. A. (2010). "Etiology of type 1 diabetes." Immunity **32**(4): 457-467.
- Trellakis, S., K. Bruderek, J. Hutte, M. Elian, T. K. Hoffmann, S. Lang and S. Brandau (2013). "Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer." Innate Immun **19**(3): 328-336.
- van Belle, T. L., K. T. Coppieters and M. G. von Herrath (2011). "Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies." Physiol Rev **91**(1): 79-118.

- Vivier, E., J. A. Nunes and F. Vely (2004). "Natural killer cell signaling pathways." Science **306**(5701): 1517-1519.
- Voisin, M. B., D. Buzoni-Gatel, D. Bout and F. Velge-Roussel (2004). "Both expansion of regulatory GR1+ CD11b+ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis." Infect Immun **72**(9): 5487-5492.
- von Herrath, M., S. Sanda and K. Herold (2007). "Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?" Nat Rev Immunol **7**(12): 988-994.
- Vossenkamper, A. and J. Spencer (2011). "Transitional B cells: how well are the checkpoints for specificity understood?" Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **59**(5): 379-384.
- Warnatz, K., A. Denz, R. Drager, M. Braun, C. Groth, G. Wolff-Vorbeck, H. Eibel, M. Schlesier and H. H. Peter (2002). "Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease." Blood **99**(5): 1544-1551.
- Warnatz, K., C. Wehr, R. Drager, S. Schmidt, H. Eibel, M. Schlesier and H. H. Peter (2002). "Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia." Immunobiology **206**(5): 502-513.
- Wehr, C., H. Eibel, M. Masilamani, H. Illges, M. Schlesier, H. H. Peter and K. Warnatz (2004). "A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE." Clin Immunol **113**(2): 161-171.
- Wenzlau, J. M., K. Juhl, L. Yu, O. Moua, S. A. Sarkar, P. Gottlieb, M. Rewers, G. S. Eisenbarth, J. Jensen, H. W. Davidson and J. C. Hutton (2007). "The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 17040-17045.
- Whitfield-Larry, F., J. Felton, J. Buse and M. A. Su (2014). "Myeloid-derived suppressor cells are increased in frequency but not maximally suppressive in peripheral blood of Type 1 Diabetes Mellitus patients." Clinical Immunology **153**(1): 156-164.
- Willcox, A., S. J. Richardson, A. J. Bone, A. K. Foulis and N. G. Morgan (2009). "Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes." Clin Exp Immunol **155**(2): 173-181.
- Wong, F. S., L. Wen, M. Tang, M. Ramanathan, I. Visintin, J. Daugherty, L. G. Hannum, C. A. Janeway, Jr. and M. J. Shlomchik (2004). "Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse." Diabetes **53**(10): 2581-2587.
- Yang, M., K. Rui, S. Wang and L. Lu (2013). "Regulatory B cells in autoimmune diseases." Cell Mol Immunol **10**(2): 122-132.
- Yin, B., G. Ma, C. Y. Yen, Z. Zhou, G. X. Wang, C. M. Divino, S. Casares, S. H. Chen, W. C. Yang and P. Y. Pan (2010). "Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models." J Immunol **185**(10): 5828-5834.
- Yosten, G. L. and G. R. Kolar (2015). "The Physiology of Proinsulin C-Peptide: Unanswered Questions and a Proposed Model." Physiology (Bethesda) **30**(4): 327-332.

- Youn, J. I., M. Collazo, I. N. Shalova, S. K. Biswas and D. I. Gabrilovich (2012). "Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." J Leukoc Biol **91**(1): 167-181.
- Youn, J. I., S. Nagaraj, M. Collazo and D. I. Gabrilovich (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." J Immunol **181**(8): 5791-5802.
- Zdunczyk, B., J. Sendela and A. Szypowska (2014). "High prevalence of depressive symptoms in well-controlled adolescents with type 1 diabetes treated with continuous subcutaneous insulin infusion." Diabetes Metab Res Rev **30**(4): 333-338.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation." J Leukoc Biol **81**(3): 584-592.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2014). "Monocyte subsets in man and other species." Cell Immunol **289**(1-2): 135-139.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn and M. B. Lutz (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." Blood **116**(16): e74-80.
- Ziegler, A. G., F. Meier-Stiegen, C. Winkler and E. Bonifacio (2012). "Prospective evaluation of risk factors for the development of islet autoimmunity and type 1 diabetes during puberty--TEENDIAB: study design." Pediatr Diabetes **13**(5): 419-424.
- Ziegler, A. G., M. Rewers, O. Simell, T. Simell, J. Lempainen, A. Steck, C. Winkler, J. Ilonen, R. Veijola, M. Knip, E. Bonifacio and G. S. Eisenbarth (2013). "Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children." Jama **309**(23): 2473-2479.
- Ziegler, A. G., R. Ziegler, P. Vardi, R. A. Jackson, J. S. Soeldner and G. S. Eisenbarth (1989). "Life-table analysis of progression to diabetes of anti-insulin autoantibody-positive relatives of individuals with type I diabetes." Diabetes **38**(10): 1320-1325.

9 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------|---|----|
| Abbildung 1 | Untergruppen von NK-Zellen definiert über die Expression von CD16 und CD56..... | 23 |
| Abbildung 2 | Gating für B-Lymphozyten..... | 44 |
| Abbildung 3 | Gating für aktivierte B-Lymphozyten..... | 45 |
| Abbildung 4 | Gating für NK-Zellen (Teil 1) | 46 |
| Abbildung 5 | Gating für NK-Zellen (Teil 2) | 47 |
| Abbildung 6 | Gating für Myeloide Suppressorzellen (MDSC)..... | 48 |
| Abbildung 7 | Gating für Monozyten-Untergruppen und Siglec-1..... | 48 |
| Abbildung 8 | Untergruppen von B-Lymphozyten im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D..... | 52 |
| Abbildung 9 | B-Lymphozyten mit der niedrigen Expression von CD21 (CD21low) im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D..... | 53 |
| Abbildung 10 | Oberflächenrezeptorexpression auf Natürlichen Killerzellen im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D..... | 55 |
| Abbildung 11 | Untergruppen von Monozyten und Expression von Siglec-1 im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D..... | 57 |
| Abbildung 12 | Myeloide Suppressorzellen im Vergleich zwischen Kindern mit T1D und Kindern ohne T1D..... | 58 |
| Abbildung 13 | Abhängigkeit der transitionalen B-Lymphozyten vom Alter..... | 59 |
| Abbildung 14 | Abhängigkeit von C-Peptid (A) und HbA1c (B) vom Anteil der transitionalen B-Lymphozyten an CD19+ B-Lymphozyten..... | 60 |

10 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabelle 1 | Übersicht über die untersuchten Zellpopulationen und Marker mit kurzer Beschreibung der Funktion und Referenz..... | 12 |
| Tabelle 2 | Charakteristika der Probanden..... | 37 |
| Tabelle 3 | Antikörpervermittelte Färbung der B-Lymphozyten für die Durchflusszytometrie..... | 41 |
| Tabelle 4 | Antikörpervermittelte Färbung der Monozyten, Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) und der Isotyp-Kontrolle für die Durchflusszytometrie..... | 41 |
| Tabelle 5 | Antikörpervermittelte Färbung der Natürlichen Killerzellen für die Durchflusszytometrie..... | 42 |
| Tabelle 6 | Untersuchte Zellpopulationen, Anzahl der Messungen pro Kohorte DiMelli oder TEENDIAB, Messergebnisse mit Standardfehler..... | 61 |

11 Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|--|
| APC-Cy7 | Allophycocyanin-Cyanin7 |
| B _{reg} | Regulatorische B-Lymphozyten |
| BV605 | Brilliant Violet 605 |
| CCR-7 | Chemokine Receptor 7 |
| CD | Cluster of Differentiation, Unterscheidungsgruppe |
| CVID | Common Variable Immunodeficiency, Variables Immundefektsyndrom |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| FBS | fetal bovine serum, fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FoxP3 | Forkhead Box Protein 3 |
| GAD65 | glutamic acid decarboxylase 65 |
| G-MDSC | Granulocytic myeloid-derived Suppressor Cells, granulozytäre Myeloide Suppressorzellen |
| HbA1c | Glykiertes Hämoglobin A1 |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| IA-2 | Insulinoma Associated Antigen-2 |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| MDSC | Myeloid-derived Suppressor Cells, Myeloide Suppressorzellen |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |

| | |
|------------------|---|
| MS | Multiple Sklerose |
| mIAA | Autoantikörper gegen Insulin |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NOD-Maus | Non-Obese Diabetic Maus, ein etabliertes Tiermodell des Typ-1-Diabetes |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PB | Pacific Blue |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute medium |
| SCID | Severe combined immunodeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt durch Fehlen von B- und T-Lymphozyten |
| Siglec-1 | Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin 1 |
| SLE | Systemischer Lupus Erythematodes |
| SOP | Standard operating procedures, Standardvorgehensweise |
| T1D | Typ-1-Diabetes |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| T _{reg} | regulatorische T-Lymphozyten |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| ZnT8 | Zinktransporter 8 |

12 Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Diabetesforschung angefertigt und verdankt ihrer Entstehung dem Zutun verschiedener Personen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Als erstes möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Anette-Gabriele Ziegler, bedanken. Für die freundliche Aufnahme in Ihr Labor, die Entwicklung des spannenden Themas und ihrer Betreuung vor allem zum Ende der Arbeit hin.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Orietta D'Orlando für die hervorragende Betreuung der Arbeit während der Experimente, die Einarbeitung in die Labormethoden und ebenso das zeitintensive Gegensehen aller Auswertungen.

Frau Dr. Ramona Puff möchte ich danken für die Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Diabetesforschung, insbesondere Jan Knoop und Maike Köhler, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung mit der Arbeit an den verschiedensten Stellen danken.

