

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Einfluss von Serumfaktoren des Typ-1-Diabetes auf die IL-7R-Expression CD4-positiver T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Souhaila El Ghardaoui

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: PD Dr. med. Julia Seyfarth

Zweitgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Max Anstötz

Meiner Familie gewidmet.

I. Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus Typ I (T1D) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, bei der sich autoreaktive Immunzellen gegen die körpereigenen insulinproduzierenden Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas richten. T-Zellen, insbesondere autoreaktive T-Zellen, spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Erkrankung. Von besonderer Bedeutung für ihre Entstehung und ihr Überleben ist der IL-7-Rezeptor (IL-7R), dessen Expression streng reguliert wird. Vorherige Untersuchungen zeigten eine erhöhte Expression des IL-7R auf CD4⁺-T-Zellen von T1D-Patienten im Gegensatz zu gesunden Kontrollen. Auch Serumveränderungen wurden beim T1D beobachtet, insbesondere wurden erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen im Serum von T1D-Patienten beschrieben. Unklar ist, ob T1D-Serumfaktoren einen Einfluss auf die veränderte IL-7R-Expression haben. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von T1D-Patientenserum auf das Expressionsniveau des IL-7R zu untersuchen.

Hierfür wurde ein in vitro Assay verwendet, im Rahmen dessen Serumproben von T1D-Patienten (n= 30) und gesunden Kontrollen (n= 30) mit Referenz-CD4-T-Zellen koinkubiert wurden. Die Expression von IL-7R α wurde an verschiedenen Tagen nach Koinkubation (Tag 1, Tag 3) durchflusszytometrisch auf den Referenz-CD4-T-Zellen sowie auf verschiedenen naiv- und Gedächtnis-*Subsets* innerhalb der CD4⁺-T-Zellen untersucht. Gleichzeitig wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Signaltransduktion (Phosphorylierung von STAT1, STAT3 und STAT5) funktionell charakterisiert.

In Anwesenheit von Serum zeigte sich eine höchst unterschiedliche Regulation des IL-7R α auf den Referenz-T-Zellen. T1D-Patientenserum führte dabei zu einer tendenziell schwächeren Hochregulation des IL-7R α . Dies betraf vor allem die *Subsets* der TEMRA (terminal differenzierte Effektor-Memory-T-Zellen) und Effektor-Memory-T-Zellen, auf denen nach Koinkubation mit Patientenserum signifikant weniger IL-7R α exprimiert wurde. Darüber hinaus wiesen die mit Patientenserum koinkubierten Referenz-T-Zellen eine signifikant geringere STAT3-Phosphorylierung auf. Diese zeigte jedoch keine direkte Korrelation mit der verminderten IL-7R α -Expression.

In dieser Studie wurde festgestellt, dass das Serum von Typ-1-Diabetes-Patienten zu einer schwächeren Expression des IL-7R α auf Referenz-T-Zellen führte. Die Ergebnisse deuten somit nicht darauf hin, dass T1D-assoziierte Serumfaktoren für die beschriebene erhöhte IL-7R-Expression auf CD4⁺-T-Zellen beim T1D verantwortlich sind. Ganz im Gegenteil dazu könnte das Serum von T1D-Patienten noch zu identifizierende gegenregulatorische Faktoren enthalten, die eine erhöhte IL-7R-Expression beim T1D teilweise kompensieren.

II. Summary

Type I diabetes mellitus (T1D) is a chronic autoimmune disease in which autoreactive immune cells are directed against the body's own insulin-producing beta cells of the pancreatic islets of Langerhans. T cells, in particular autoreactive T cells, play a central role in the pathogenesis of the disease. Of particular importance for their development and survival is the IL-7 receptor (IL-7R), the expression of which is strictly regulated. Previous studies have shown an increased expression of IL-7R on CD4⁺ T cells of T1D patients in contrast to healthy controls. Serum changes have also been observed in T1D, in particular, increased levels of proinflammatory cytokines have been described in the serum of T1D patients. It is unclear whether T1D serum factors have an influence on the altered IL-7R expression. The aim of this study was to investigate the impact of T1D patient serum on the expression level of IL-7R.

For this purpose, an in vitro assay was used in which serum samples from T1D patients (n=30) and healthy controls (n=30) were coincubated with reference CD4⁺ T cells. IL-7R α expression was analysed on different days after coincubation (day 1, day 3) by flow cytometry on the reference CD4⁺ T cells, as well as on different naive and memory subsets within the CD4⁺ T cells. At the same time, the cells were functionally characterized with regard to their signal transduction (phosphorylation of STAT1, STAT3 and STAT5).

In the presence of serum, the regulation of IL-7R α on the reference T cells was found to be highly variable. T1D patient serum tended to lead to a weaker upregulation of IL-7R α . This mainly affected the subsets of TEMRA (terminally differentiated effector memory T cells) and effector memory T cells, on which significantly less IL-7R α was expressed after coincubation with patient serum. In addition, the reference T cells coincubated with patient sera showed significantly lower STAT3 phosphorylation. However, this showed no direct correlation with the reduced IL-7R α expression.

In this study, it was found that serum from type 1 diabetes patients led to weaker expression of IL-7R α on reference T cells. Thus, the results do not suggest that T1D-associated serum factors are responsible for the described increased IL-7R expression on CD4⁺ T cells in T1D. On the contrary, the serum of T1D patients may contain yet-to-be-identified counter-regulatory factors that partially compensate for increased IL-7R expression in T1D.

III. Abkürzungsverzeichnis

Ak.....	Antikörper
APCs.....	<i>antigen-presenting cells</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
FBS.....	fetales bovines Serum
FSC.....	<i>forward light scatter</i>
FSC-H	<i>forward scatter height</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IL	Interleukin
INF	Interferon
JAK	Januskinasen
MFI.....	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC.....	<i>major histocompatibility complex</i>
NHS.....	normalisiertes humanes Serum
PBMCs.....	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS.....	<i>phosphate-buffered saline</i>
pSTAT.....	<i>phosphorylated signal transducers and activators of transcription</i>
SSC.....	<i>sideward light scatter</i>
SSC-A.....	<i>sideward scatter area</i>
T1D	Diabetes Mellitus Typ I
T _{CM}	<i>central memory T cells</i>
TCR.....	<i>T cell receptor</i>
T _E	<i>Effektor-T-Zelle</i>
T _{EM}	<i>effector memory T cells</i>
TEMRA	<i>terminal T effector memory cells re-expressing CD45RA</i>
T _{fh}	Follikuläre T-Helferzellen
T _G	T-Gedächtniszellen
Th1/1*/2/17	T-Helferzelle Typ 1/1*/2/17
T _H	T-Helferzelle
T _N	Naive T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{regs}	Regulatorische T-Zellen

IV. Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	I
II. Summary	II
III. Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Einführung in den Typ-1-Diabetes	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Einblick in die Pathophysiologie	2
1.2 Rolle der T-Zellen in T1D	3
1.2.1 Differenzierung: Naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen	3
1.2.2 T-Zell-Aktivierung und JAK-STAT-Signalweg	6
1.3 Einführung von IL-7 und dem IL-7-Rezeptor	8
1.3.1 Struktur und biologische Rolle	8
1.3.2 IL-7 und IL-7R beim Typ-1-Diabetes	10
1.3.3 Regulation der Expression des membranösen IL-7R	14
1.4 Serumfaktoren beim Typ-1-Diabetes	16
1.4.1 Inflammatorische Zytokine und weitere Faktoren	16
1.4.2 Anti-inflammatorische Zytokine	17
1.5 Ziele der Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	23
2.1.4 Medien und Zellkulturbestandteile	24
2.1.5 Antikörper	25
2.1.6 Kits & Stimulanzen	27
2.1.7 Software	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Studiendesign	28
2.2.2 Studienkollektiv	28
2.2.3 Versuchsaufbau	29
2.3 Zellbiologische Methoden	32

2.3.1	Isolation humaner T-Zellen aus dem peripheren Vollblut	32
2.3.2	Kultivierung humaner T-Zellen	33
2.4	Bestimmung von intrazellulären- und Oberflächenmarkern	34
2.4.1	Färbung der T-Zellen	34
2.4.2	Durchflusszytometrie	36
2.4.3	Datenanalyse und <i>Gating</i> -Strategie.....	37
2.5	Statistische Auswertung.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Klinische Daten der Patienten- und Kontrollgruppe	40
3.2	Einfluss von T1D-Serumfaktoren auf die IL-7R α -Expression.....	41
3.2.1	Seruminduzierte IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen im Zeitverlauf.....	41
3.2.2	Kohortenvergleich der IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen	42
3.2.3	IL-7R α -Expression auf T-Zell- <i>Memory-Subsets</i>	43
3.2.4	Kohortenunterschiede in der Zusammensetzung der T-Zell- <i>Memory-Subsets</i>	45
3.2.5	IL-7R α -Expression auf T-Zell- <i>Memory-Subsets</i> im Kohortenvergleich	47
3.3	Einfluss von T1D-Serumfaktoren auf die STAT-Phosphorylierung in CD4+-T-Zellen.....	51
3.3.1	STAT-vermittelte Signaltransduktion	51
3.3.2	Korrelation von pSTAT3 mit IL-7R α	52
4	Diskussion	54
4.1	Anwendungen des Serum-Assays: Untersuchung des Einflusses einer krankheitsspezifischen Serumsignatur auf den Immunzell-Phänotyp	54
4.2	Einfluss des Serums auf naive und <i>Memory-Subsets</i>	54
4.3	Einfluss des Serums auf die IL-7R-Expression	55
4.4	Einfluss des Serums auf die STAT-Phosphorylierung.....	59
4.5	Limitationen der Methode	60
4.6	Schlussfolgerungen	62
	Literatur- und Quellenverzeichnis	63
	Abbildungsverzeichnis	73
	Tabellenverzeichnis	73
	Anhang	74
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Einführung in den Typ-1-Diabetes

1.1.1 Epidemiologie

Der Typ-1-Diabetes mellitus (T1D) stellt im Kindes- und Jugendalter die häufigste Diabetesform sowie Autoimmunerkrankung dar. Geschätzt sind weltweit 8,4 Millionen Menschen an einem T1D erkrankt. In Deutschland sind aktuell über 32.000 Kinder und Jugendliche sowie 341.000 Erwachsene mit einem T1D diagnostiziert [1]. Dies entspricht zusammengekommen 0,4 % der deutschen Gesamtbevölkerung. Der T1D scheint in zwei Höhepunkten aufzutreten: Im Kindesalter zwischen fünf und sieben Jahren sowie im Jugendalter um die Pubertät herum [2]. Für die Jahre 2002 bis 2020 wurde ein jährlicher Anstieg der Prävalenz – auf der Basis von Daten von 0- bis 19-Jährigen – um durchschnittlich ca. 2,9 % geschätzt. Zum Ende der Beobachtungszeit flachte dieser ansteigende Trend jedoch ab [3]. Die Prävalenz des T1D betrug für unter 18-Jährige im Jahr 2020 235,5 pro 100.000 Personen mit höheren Werten bei Jungen als bei Mädchen [4]. Zwischen 2014 und 2020 änderte sich, wie oben angedeutet, die Prävalenz kaum: Der durchschnittliche jährliche Anstieg der Prävalenz betrug für Mädchen ca. 0,2 % und für Jungen ca. 0,4 % [4]. In Zukunft wird mit einem weiteren Anstieg der Diabetesprävalenz gerechnet [5].

Darüber hinaus wird die Inzidenz in Nordeuropa als am höchsten [6], auf dem asiatischen Kontinent hingegen als am niedrigsten, beschrieben [7]. Bei Betrachtung der Jahre 2002 bis 2022 lag die durchschnittliche, inländische Inzidenz bei etwa 23,9 Fälle pro 100.000 Personenjahre bei den unter 20-Jährigen [8]. Von 1999 bis 2019 stieg die Inzidenz jährlich um durchschnittlich ca. 2,5 % [9]. Die zunehmende Inzidenz betrifft vor allem Kinder unter fünf Jahren [10] und innerhalb Europas die zentralen und östlichen Länder [11]. Die Inzidenzen und Prävalenzen des Diabetes in Deutschland sind regional inhomogen verteilt: Die Inzidenz im Kindes- und Jugendalter wurde als tendenziell höher in weniger benachteiligten Gebieten beschrieben, was auf Unterschiede im Lebensstil und die Exposition mit Infektionen zurückgeführt wurde [12].

Internationale Studien zeigten, dass die alters- und geschlechtsspezifischen Mortalitätsraten generell bei an Diabetes Erkrankten in den letzten Jahrzehnten gesunken sind [13-16]. Der Untersuchung des Diabetes mellitus als einer der zehn häufigsten Erkrankungen weltweit kommt also eine besondere Bedeutung zu.

1.1.2 Einblick in die Pathophysiologie

Beim Diabetes mellitus Typ I (T1D) handelt es sich um eine chronische Autoimmunerkrankung, bei der sich autoreaktive Immunzellen gegen die körpereigenen insulinproduzierenden Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas richten. Hierdurch kommt es zu einer selektiven Zerstörung der Beta-Zellen im Rahmen einer Insulitis, welche im Verlauf eine lebenslange Insulintherapie erforderlich macht.

Tiermodelle und genetische Studien verdeutlichen die bedeutende Rolle autoimmunbasierter Mechanismen beim T1D [17, 18]. Autoimmunerkrankungen entwickeln sich typischerweise über einen längeren Zeitraum, häufig aufgrund des Zusammenspiels von mehreren Faktoren. Auch beim T1D geht man von einer multifaktoriellen Ätiologie aus, bei welcher sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen [19]. Bei genetischer Betrachtung scheinen bestimmte Varianten im HLA-Genkomplex (Humanes Leukozyten-Antigen), insbesondere HLA-DR (-3/-4) und -DQ (-8) auf Chromosom 6, mit einem erhöhten Risiko für T1D assoziiert zu sein [20]. Viel diskutierte Umweltfaktoren sind unter anderem die Säuglingsernährung, enterovirale Infektionen und ein Vitamin-D-Mangel [21]. Die Wechselwirkung aus genetischen Prädispositionen und Umweltfaktoren löst eine fehlgeleitete Immunreaktion in Form einer Induktion der Beta-Zell-Zerstörung aus. Erklärungsansätze hierfür basieren auf einer immunologischen Dysregulation, z. B. einer gestörten zentralen Toleranzentwicklung, einer aberranten peripheren T-Zell-Aktivierung sowie zytokin-induzierten entzündlichen Prozessen [22, 23]. Dies kann in die Ausbildung und Aktivierung von autoreaktiven Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen resultieren [24]. Diese – durch APCs aktivierten – autoreaktiven CD4+-T-Zellen aktivieren wiederum die zytotoxischen CD8+ T-Zellen sowie B-Lymphozyten, welche für die Zerstörung der Beta-Zellen verantwortlich sind.

Autoreaktive T-Zellen lassen sich ebenfalls in Gesunden in ähnlicher Anzahl finden [25]. Bedeutender Unterschied ist jedoch, dass diese Population in gesunden Kontrollen von einem naiven Phänotyp geprägt ist, wobei in T1D-Patienten¹ autoreaktive Zellen vom (Effektor-)[26] Gedächtnis-Zelltyp vorherrschen [25, 27, 28]. Letzterer Zelltyp reagiert empfindlicher auf eine Antigenstimulation [29]. In Kombination mit weiteren Faktoren wie erhöhten proinflammatorischen Zytokinen könnte dies einen Einfluss auf die Differenzierung in diabetogene Effektor T-Zellen (T_E) haben [26].

Hieraus lässt sich schließen, dass vor allem die periphere Toleranz beeinträchtigt ist und es zu einem Wechsel von naiven zu hochpathogenen Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen kommt [24]. Die Tatsache, dass diese langlebig sind und keine Kostimulation für ihre klonale Expansion benötigen, führt zu einem persistenten autoreaktiven Zustand [24].

1.2 Rolle der T-Zellen in T1D

1.2.1 Differenzierung: Naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen

In der Entwicklung des T1D geht man davon aus, dass ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen (Tregs) und T_E sowie Veränderungen in der T-Zell-Polarisierung der T_E zur Pathogenese des T1D beitragen. Die T-Zellen, insbesondere immunmodulatorisch wirkende $CD4^+-T_H$ (CD4-positive T-Helferzellen), sind also die zentralen Effektoren, wobei autoreaktive Mechanismen eine wichtige Rolle spielen. Infiltrierende autoreaktive T-Zellen sind verantwortlich für die pankreatische Insulitis, welche zur Beta-Zell-Zerstörung führt. Calzascia et al. zeigten modellhaft, dass der Transfer von aktivierten, autoreaktiven $CD4^+-$ T-Zellen zum *Priming* und zur Expansion von eigenen autoreaktiven $CD8^+$ T-Zellen führen kann [30]. Die Häufigkeit von autoreaktiven T-Zellen, welche spezifisch gegen Beta-Zell-Epitope gerichtet sind, ist in T1D-Patienten jedoch gering [31].

Aufgrund der Bedeutung der $CD4^+-$ T-Zellen für den T1D, sind deren Differenzierungsstadien von besonderer Relevanz. Nach Aktivierung der T-Zellen entwickeln sich naive T-Zellen (T_N) während der Wachstumsphase zuerst größtenteils zu kurzlebigen T-Effektorzellen, welche

¹ Für einen besseren Lesefluss wird das generische Maskulinum verwendet. Dabei sind weibliche und anderweitige Geschlechtsidentitäten ausdrücklich mit eingeschlossen, sofern es für die Aussage relevant ist.

in der Lage sind, diejenigen Effektormoleküle zu synthetisieren, die benötigt werden, um ihre Funktion als Helfer- oder zytotoxische T-Zelle auszuführen. Im Verlauf können sie zu T-Gedächtniszellen (T_G) transformiert werden. Aus einer adaptiven Immunantwort resultiert also die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Reaktion von T_G unterscheidet sich von denen der T_N oder T_E in Bezug auf Lokalisierung, Effektorfunktion und Bewegungsmuster. Einige durch Antigenkontakt aktivierte, naive T-Zellen, die den IL-7-Rezeptor weiterhin exprimieren, können sich jedoch unmittelbar zu langlebigen T_G entwickeln. Der IL-7R ist einer der wichtigsten Marker der T_G . T_G benötigen für ihr Überleben nämlich die Zytokine IL-7 sowie IL-15. Der IL-7R wird ebenfalls von T_N exprimiert, da diese ebenfalls IL-7 und IL-15 sowie den Kontakt zu Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexen als Überlebenssignal benötigen; die Expression nimmt nach der Aktivierung allerdings rapide ab. Die meisten T_E exprimieren diesen Rezeptor nicht. (Absatz [32])

Darüber hinaus können naive Zellen von Effektor- und Gedächtniszellen anhand der Expression zusätzlicher charakteristischer Oberflächenmarker differenziert werden. Bei der Differenzierung kommt es zur Veränderung der Oberflächenexpression von z. B. Adhäsionsmolekülen, Chemokinrezeptoren oder Rezeptoren, welche das Überleben sichern [32]. Naive Zellen tragen sowohl CCR7 als auch CD45RA auf ihrer Oberfläche [32]. Kennzeichnend für die Gedächtniszellen ist die CD45RO-Isoform [32]. Diese scheinen in der Pathogenese des T1D essenziell zu sein, denn Autoantigen-spezifische CD4+-T-Gedächtniszellen sind in der frühen Phase der Entwicklung des T1D vorherrschend [25]. Zudem sind aktivierte CD4+-T-Gedächtniszellen in der Lage mit CD8+ naiven T-Zellen zu kommunizieren und aus ihnen autoreaktive T-Zellen zu generieren [33].

Die CD4+-T-Gedächtniszellen sind vielfältig und können in unterschiedliche Subpopulationen klassifiziert werden [32]. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}): Diese Subpopulation exprimiert den Chemokinrezeptor CCR7, welcher die Zirkulation zwischen Blut und sekundär lymphatischen Geweben ermöglicht [32]. Bei Antigenstimulation produzieren sie vor allem IL-2 [34] und nach einer Vermehrungsphase regulieren sie CCR7 herunter und differenzieren sich zu Effektor-Gedächtnis-T-Zellen [35]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der zentralen CD4+-Gedächtnis-T-Zellen mit einem verlangsamten Rückgang des C-Peptids in kürzlich diagnostizierten T1D-Patienten assoziiert

ist [36]. Dies könnte Auswirkungen auf die Geschwindigkeit des Krankheitsprogresses haben.

Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}): Sie exprimieren keinen CCR7 [34], sondern Integrine, durch welche sie in entzündete Gewebe einwandern können [32]. Zusätzlich exprimieren sie Rezeptoren für inflammatorische Zytokine und können zu Effektor-T-Zellen heranreifen [32]. Nach Neustimulation produzieren sie INF- γ (Interferon- γ), IL-4 und IL-5 [32]. Sie zirkulieren zwischen Blut, nicht-lymphatischem Gewebe und dem lymphatischen System [32]. Kürzlich durchgeführte Studien deuten auf eine generell veränderte Effektor-T-Zell-Antwort beim T1D im Sinne von chronisch aktivierten T-Zellen hin, welche einen Effektor-Gedächtnis-Phänotyp aufweisen und durch eine erhöhte Zytokin-Produktion charakterisiert sind [35]. Die Ursache der chronischen Aktivierung ist bislang unbekannt, jedoch gibt es Hinweise auf eine beeinträchtigte periphere Regulation aufgrund u. a. genetischer Varianten beim T1D [37-39]. Zudem zeigten Patienten mit kürzlich diagnostiziertem T1D eine gesteigerte Häufigkeit an Insulin-spezifischen CD4+-T-Zellen mit einem Effektor-Gedächtnis-Phänotyp, welche mit den Insulin-Autoantikörpern korrelierten [40].

TEMRA (*terminal T effector memory cells re-expressing CD45RA*): Sie ähneln den T_{EM} , reexprimieren jedoch die CD45RA-Isoform [34] und machen <0,3 % bis nahezu 18 % der CD4+-T-Zellen aus [41]. Einige der TEMRA-Zellen exprimieren seneszente Marker wie PD-1 (*programmed cell death protein-1*) [42]. Es handelt sich hierbei um eine seneszente Zellpopulation mit niedrigerer proliferativer Aktivität, welche mit dem Alter bzw. nach stattgehabter Infektion mit bestimmten Erregern akkumuliert [43, 44]. Sie entwickeln einen seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp, der durch die Sekretion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen geprägt ist und in niedriggradigen Entzündungen resultiert [45, 46]. Matteucci et al. beschrieben, dass die Häufigkeit der TEMRA-Subpopulation bei T1D-Patienten stark erhöht ist im Gegensatz zu gesunden Kontrollen. Dies kann auf eine lebenslange Stimulation der TEMRA durch Antigen-Exposition hindeuten [47].

Diese Eigenschaften der verschiedenen Subpopulationen bestimmen, mit welchen weiteren Immunzellen sie interagieren und beeinflussen folglich die nachfolgenden Effektorfunktionen.

1.2.2 T-Zell-Aktivierung und JAK-STAT-Signalweg

Für die Aktivierung naiver T-Zellen sind drei Arten von Signalen von Nöten, die durch die APCs (*antigen-presenting cells*, z. B. dendritische Zellen) bereitgestellt werden [32].

1. Für die Aktivierung binden der TCR und der CD4-Co-Rezeptor (*cluster of differentiation*) an einen spezifischen MHC-Peptid-Komplex [32, 48].
2. Es bedarf jedoch eines zweiten, kostimulatorischen Signals [49]. Dazu bindet CD28 (Rezeptor der T-Zelle) an das B7-Molekül der APCs. Dieses Molekül ist ein homodimerer Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie und findet sich nur auf Zellen, welche die T-Zell-Proliferation stimulieren [32]. Durch das zweite Signal kann die T_N länger überleben und die klonale Expansion einleiten [32]. Bei einem Mangel an Kostimulation oder bei Vorhandensein eines ko-inhibitorischen Signals geht die T-Zelle in einen Zustand der Anergie über [50, 51].
3. Das dritte Signal bestimmt über die Differenzierung und die hierbei hervorgehenden Untergruppen von T_E [32]. An dieser Steuerung der Zelllinie sind nicht ausschließlich, aber vor allem, Zytokine beteiligt [50, 52]. Die unterschiedlichen Zytokin-Kombinationen können sowohl über positive Rückkopplungsschleifen die eigene Differenzierung aus naiven T-Zellen und somit eine bestimmte Effektor-Reaktion fördern als auch über negative Rückkopplungsmechanismen die übrigen Reaktionen unterdrücken. (Absatz [32]). Bei Antigen-Erkennung wird das Aktivierungssignal schließlich über den CD3-Komplex an den Zellkern weitergeleitet [53].

Zahlreiche für die Immunantwort und Entzündungsprozesse zentrale Zytokine stimulieren den intrazellulären JAK-STAT (Januskinase)-Signalweg, welcher spezifische Gene aktiviert. Verschiedene Mitglieder der JAK- und STAT-Familie werden durch unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert, leiten deren Signale weiter und lösen hierdurch verschiedene Effektorwege aus. Folglich wird ein spezifisches Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren aktiviert, welches über das Genexpressionsprofil der T_E entscheidet [32]. Dabei nehmen JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) die Rolle eines Kopplungsglieds zwischen dem Zytokinrezeptor und dem Transkriptionsfaktor STAT (STAT1, -2, -3, -4, -5a/5b, -6) ein [32]. Die Kinase phosphoryliert nämlich die STAT-Proteine an Tyrosin-Resten, welche anschließend dimerisieren und in den Zellkern transloziert werden, um über die Bindung an bestimmten DNA-Sequenzen die Transkription spezifischer Gene zu regulieren

[32]. Dadurch werden zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Immunität beeinflusst.

Besonderes Augenmerk liegt auf der Phosphorylierung der immunologisch äußerst relevanten STAT-Proteine 1, 3 und 5. Das STAT-Protein 1 wird über die Bindung von Liganden wie Interferonen an spezifische Zytokinrezeptoren aktiviert. Bei der Bindung von Typ-1-Interferonen (IFN- α und IFN- β) werden die JAK-Kinasen TYK2 und JAK1 aktiviert, welche STAT1 und STAT2 phosphorylieren [54]. Binden wiederum Interferone vom Typ 2 (IFN- γ) an die Zytokinrezeptoren, wird STAT1 an den Tyrosin- und Serinresten phosphoryliert [55]. STAT1 spielt u. a. eine Rolle bei der Apoptose sowie der Immunität gegen virale, mykobakterielle und fungale Erreger [56].

Gain-of-function- und *Loss-of-function*-Mutationen in den JAKs und STAT-Proteinen können zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems sowie zu Autoimmunerkrankungen führen [57]. Beispielsweise wurden bei Patienten mit *Gain-of-function*-Mutationen im STAT1 sowohl die Immundefizienz 31C [58] als auch Autoimmunerkrankungen wie der T1D beobachtet [59]. Eine dysregulierte STAT1-Aktivität moduliert die Immunantwort und erhöht die Anfälligkeit von Beta-Zellen für autoimmune Zellzerstörung [60].

Der STAT3-Signalweg wird durch die Bindung von Zytokinen wie z. B. IL-6 bzw. Wachstumsfaktoren (z. B. EGF) an Zelloberflächenrezeptoren aktiviert [61]. STAT3 ist beteiligt an der Modulation der T-Zell-Antwort [62], der Steuerung pro- und antiinflammatorischer Signalwege [63, 64] und der Tumorentstehung [65]. Verstärktes STAT3-*Signalling* wurde bei Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus erythematoses [66] oder der rheumatoiden Arthritis beobachtet [67]. *Gain-of-function*-Mutationen des STAT3 sind mit der frühen Entstehung eines T1D assoziiert [68]. Ursächlich ist ein gestörtes Gleichgewicht in der T-Zell-Differenzierung, bei der regulatorische T-Zellen beeinträchtigt und die Differenzierung in entzündungsfördernde Th17-Zellen begünstigt werden [69] sowie die gesteigerte Bildung von zytotoxischen CD8+ T-Zellen [68].

STAT5 wird durch die Bindung verschiedener Interleukine wie z. B. IL-7 aktiviert. Es spielt eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Immunzellen, einschließlich T-Zellen [70], sowie in der Tumorentstehung [71]. Beim T1D ist STAT5 in der Proliferation und Funktion der Beta-Zellen von Interesse. Eine verminderte Aktivität kann die Proliferation reduzieren und die Anfälligkeit für Diabetes erhöhen [72]. Zudem dient STAT5 dem Erhalt des Gleichgewichts regulatorischer T-Zellen und der Selbsttoleranz [73].

1.3 Einführung von IL-7 und dem IL-7-Rezeptor

1.3.1 Struktur und biologische Rolle

Der IL-7R wird hauptsächlich auf T-Zellen, B-Vorläuferzellen sowie angeborenen lymphoiden Zellen exprimiert [74]. Es handelt sich um einen Heterodimer bestehend aus dem IL-7R α (CD127) sowie der allgemeinen Zytokinrezeptor-Gamma-Kette (CD132) [75-77]. Letztere stellt ebenfalls einen Bestandteil der IL-2, -4, -9, -15 und -21 Rezeptoren dar [78]. Der Rezeptor, über welchen die Signale von IL-7 weitergeleitet werden, ist für die T-Zell-Proliferation, -Differenzierung sowie -Gedächtnisformierung essenziell [75]. Die IL-7R α -Untereinheit besteht aus drei Domänen: der extrazellulären Kette für die Ligandenbindung, der Transmembrandomäne sowie dem zytoplasmatischen Teil für das intrazelluläre *Signalling* [79]. Beim Signalling kommt es zu Konformationsänderungen, sodass sich der Abstand zwischen dem IL-7R α und der Gamma-Kette von 110 Å auf weniger als 30 Å reduziert [79]. Der IL-7R aktiviert bei Zytokinbindung zwei Hauptsignalwege: einerseits den JAK1/-3/STAT5- und andererseits den PI3K-AKT-Signalweg [80-82]. Der IL-7R wird von den meisten ruhenden T-Zellen exprimiert und durch die Transkriptionsfaktoren FOXO1 (*forkhead box protein O1*) und ETS1 (*erythroblast transformation specific*) erhalten [83-85]. Die T-Zell-Aktivierung und IL-7-Bindung sind wichtige Mechanismen der IL-7R α -*Downregulation* [86, 87], was zu einer niedrigeren Oberflächenexpression führt. Zudem hängt die T-Zell-Sensitivität für IL-2 und IL-7 von den IL-2R und IL-7R-Expressionsleveln ab [88]. Hierarchien in der Zytokinantwort könnten auf unterschiedliche Kapazitäten, die allgemeine Gamma-Kette zu binden, basieren. Hierdurch kann die Verfügbarkeit der Gamma-Kette für andere Familienmitglieder reduziert werden [89]. Ein folglich zu starkes IL-7-*Signalling* könnte zu verstärkter Lymphzellproliferation führen und dadurch zur Entwicklung der akuten lymphatischen Leukämie beitragen [90, 91]. Ein vermindertes IL-7-*Signalling* kann hingegen zu einem schweren kombinierten Immundefekt, mit eingeschränkter Immunität gegen chronische Infektionen, führen [92].

In naiven T-Zellen wird der Rezeptor langsam internalisiert und degradiert, wobei eine signifikante Fraktion zurück auf die Oberfläche *recycle*t wird. Bei IL-7 Stimulation kommt es hingegen zu einer raschen Endozytose des IL-7R mittels Clathrin-ummantelten Partikeln und beschleunigter Lysosom- und Proteasom-abhängiger Degradierung [93]. Die Expression ist auf aktivierten Effektor-T-Zellen und terminal differenzierten, seneszenten

T-Zellen jedoch herabreguliert; die regulatorischen T-Zellen exprimieren ebenfalls nur noch niedrige Level [76, 94, 95]. Der Rezeptor ist ein Modulator der Effektor- zu Gedächtniszell-Transition [96, 97], indem er selektiv auf einer Minderheit von T-Effektorzellen exprimiert wird, welche dazu prädestiniert sind, in den zentralen Gedächtnis-T-Zell-Pool einzutreten [98].

IL-7 ist ein nicht-redundantes und pleiotropes Zytokin, welches durch das IL-7-Gen codiert und zu der Zytokin-Familie der allgemeinen Gamma-Kette gezählt wird [77, 79, 87, 99]. Es handelt sich um einen hämatopoetischen Wachstumsfaktor, welcher kontinuierlich von stromalen Zellen des Knochenmarks und Thymus gebildet wird, jedoch auch im humanen Plasma im Rahmen der Bildung durch Keratinozyten, Darm-Epithelzellen, andere parenchymatöse Zellen sowie dendritische Zellen detektiert wurde [100-102]. Die zirkulierende Konzentration von IL-7 scheint größtenteils stabil zu sein [103]. IL-7 ist für das Überleben der T-Zellen essenziell, wobei dessen Einfluss teilweise durch das Zytokin TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), welches über den Komplex aus IL-7R α und dem TSLP-Rezeptor Signale übermittelt, ersetzt werden kann [104]. IL-7 allein ist fähig, Monozyten bzw. Makrophagen und NK-Zellen zu aktivieren [105], für eine T-Zell-Aktivierung ist jedoch die gleichzeitige Formierung eines TCR-MHC-Peptid-Komplexes nötig. Das Zytokin scheint sich hierbei im Effekt auf spezifische T-Zell-Subgruppen zu unterscheiden: Es wirkt auf eine junge Untergruppe von naiven T-Zellen, den sog. RTEs (*recent thymic emigrants*), am potentesten und kann hier die Proliferation unabhängig vom TCR induzieren [82, 106]. Zudem besteht eine inverse Korrelation zwischen dem zirkulierenden IL-7-Spiegel und der CD4⁺-T-Zellzahl, was einen *Feedback*-Mechanismus darstellt [75, 107-110].

Bei Bindung von IL-7 an den IL-7R α wird die allgemeine Zytokinrezeptor-Gamma-Kette rekrutiert [111]. Das IL-7-*Signalling* läuft hauptsächlich über den JAK-STAT-Weg. Die an den IL-7R gebundenen Proteine JAK1 und JAK3 werden beide phosphoryliert [112], sodass Tyr449 aktiviert wird und als Andockstelle für STAT-Proteine dienen kann. Hauptsächlich STAT5 wird infolge der IL-7-Bindung phosphoryliert und dadurch aktiviert. STAT1 und STAT3 können ebenfalls aktiviert werden [76, 113, 114], jedoch ist das Andocken an den IL-7R α hierfür nicht notwendig [115]. Die hieraus entstehenden STAT-Dimere werden in den Nukleus transloziert und können schließlich die Gentranskription (z. B. des anti-

apoptotischen Bcl-2) fördern [77, 80, 116]. Die Bcl-2-Expression scheint langlebig zu sein und benötigt zur Aufrechterhaltung intermittierende statt kontinuierliche IL-7-Signale, denn ein zu starkes IL-7-Signalling könnte zu einem „zytokininduzierten Tod“ führen [117].

1.3.2 IL-7 und IL-7R beim Typ-1-Diabetes

IL-7/IL-7R und Autoimmunität

Das IL-7/IL-7R-System spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Immunsystems und ist eng mit der Entwicklung von Autoimmunität verbunden. Dieses Signalnetzwerk hat einen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion von T-Zellen und kann bei Dysregulation zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie T1D, multipler Sklerose oder rheumatoider Arthritis beitragen [30, 76, 118, 119]. Eine erhöhte IL-7- und IL-7R-Expression wurde beispielsweise in Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis festgestellt, welche mit dem Krankheitsaktivitätsindex korreliert und zur Entzündungsreaktion in den Gelenken beitragen kann [120]. In lymphopenischen Zuständen (z. B. bei Immundefekten, immunsupprimierenden Behandlungen [121]) spielt IL-7 eine Rolle in der Steigerung der Reaktivität gegen Autoantigene [122], sodass erhöhte IL-7-Spiegel für Autoimmunität prädisponieren können [76]. Darüber hinaus beeinflussen erhöhte IL-7-Spiegel das Verhältnis von regulatorischen zu Effektor-T-Zellen. Periphere Toleranz erfordert Signale, welche selektiv zum Erhalt von T_{regs} beitragen, während gleichzeitig diejenigen Signale gehemmt werden müssen, die die Effektor-T-Zellen aufrechterhalten. Diese Signale werden durch homöostatische Zytokine wie IL-2 und IL-7 geliefert [123]. Es wurde beschrieben, dass eine Stimulation mittels IL-7 zur Hochregulation des IL-2R α auf T-Gedächtniszellen führt, sodass es vermutlich zu einer kompetitiven Restriktion der IL-2-Verfügbarkeit zwischen T_{regs} und T-Gedächtniszellen kommt [124]. Daher könnte IL-7 das Gleichgewicht zwischen Effektor- und regulatorischen T-Zellen in Richtung eines Autoimmunität-fördernden Zustandes beeinflussen [123]. In einer weiteren Studie unterdrückte IL-7 die Fähigkeit von T_{regs}, die Proliferation von T-Zellen als Antwort auf ein (Auto-)Antigen zu inhibieren [125].

Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, dass die IL-7R-Expressions- und IL-7-Serumlevel einen Einfluss auf die Immunantwort haben, sodass eine Intervention in den IL-

IL-7/IL-7R-Weg einen therapeutischen Ansatz darstellen kann. Beispielhaft wurden Antikörperstudien am IL-7R α durchgeführt, welche sich als therapeutisch relevant erwiesen. Die Blockade des IL-7R α mithilfe von Antikörpern bei T1D-Patienten führte zu einer signifikanten Reduktion von CD4+-Effektor- und zentralen Gedächtnis-T-Zellen sowie von naiven T-Zellen, während T_{regs} nicht beeinflusst wurden. Dies deutet darauf hin, dass eine solche Blockade das Potenzial hat, pathogene T-Zellen im T1D herunterzuregulieren [153]

IL-7/IL-7R im Tiermodell des T1D

Einige Studien, die die Rolle des IL-7/IL-7R-Systems beim T1D untersucht haben, wurden im Rahmen von Tiermodellen, allen voran dem NOD-Mausmodell (*non obese diabetic*), durchgeführt. Das NOD-Mausmodell dient als besonders geeignetes Tiermodell für den T1D beim Menschen, denn dieser Inzucht-Stamm weist eine hohe Inzidenz an spontan auftretendem Diabetes mellitus auf, welcher durch Autoimmunprozesse hervorgerufen wird [126]. Im NOD-Mausmodell führte die exogene Zufuhr von IL-7 oder eine lymphopenie-induzierte IL-7-Produktion zu einer exazerbierten Beta-Zell-Zerstörung [30]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine IL-7R α -Antikörper-Therapie vor der Entwicklung eines autoimmunen Diabetes schützen kann und eine vollständige Remission in Mäusen mit neu aufgetretenem Diabetes erreicht werden konnte [123, 127-129]. Darüber hinaus konnte auch mithilfe dieses Modells gezeigt werden, dass sich das Zusammenspiel zwischen IL-7 und dem IL-7R auf das Verhältnis von regulatorischen- zu Effektor-T-Zellen auswirkt. Es wurde beschrieben, dass die IL-7R α -Blockade zu einer verstärkten Inaktivierung von Effektor-T-Zellen führte [128] und die Häufigkeit von T_{regs} im zirkulierenden CD4+-T-Zellpool anstieg [129].

Zudem ist IL-7 unabdingbar für die Aufrechterhaltung der CD4+-T-Gedächtniszellen, was mithilfe von IL-7R α -blockierenden Antikörpern bzw. -defizienten Mäusen demonstriert werden konnte [96, 97, 130]. Autoreaktive T-Zellen nutzen vermutlich auch IL-7 für ihre Überlebenssicherung, ein direkter Nachweis ist jedoch schwierig zu etablieren. In autoimmunen Zuständen wurde auch eine Expression von IL-7 an den Entzündungsorten beschrieben, was wahrscheinlich das Überleben der autoreaktiven Zellen im entzündeten

Gewebe fördert [131, 132]. Bei Mäusen beobachtete Ergebnisse lassen sich jedoch nicht immer auf den Menschen übertragen, da Mäuse evolutionär gesehen vielfältige Kontakte zu einem von der humanen Spezies abweichenden Pathogenspektrum hatten [133, 134].

IL-7/IL-7R beim humanen T1D: Genetik

Ein erhöhter Schutz bzw. gesteigerte Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen, insbesondere für T1D, wurde mit bestimmten IL-7R α -Genpolymorphismen, sog. SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), assoziiert [123, 135, 136]. Bisher wurden vier Haupt-Haplotypen des IL-7R α -Gens beschrieben [137]. Der im Zusammenhang mit T1D häufig beschriebene SNP rs6897932 [138] befindet sich im Exon 6 des IL-7R α -Gens und beeinflusst durch Modulation des alternativen Spleißens das Gleichgewicht zwischen der membrangebundenen und löslichen Form des IL-7R α . Der protektive SNP rs6897932T reduziert das Spleißen der Transmembrandomäne (Exon 6), wodurch weniger sIL-7R α gebildet wird und auf die Entwicklung eines T1D eine schützende Wirkung hat [139]. Mit einem protektiven SNP assoziierte niedrigere sIL-7R α -Serumlevel wurden mehrfach beschrieben [136, 137, 140, 141], was die Verfügbarkeit von IL-7 für autoreaktive T-Zellen beschränken kann [142, 143]. Hinweisend hierfür sind tendenziell erniedrigte IL-7-Serumlevel bei T1D-Patienten mit protektivem Haplotyp [140].

Vorherige Studien demonstrierten andererseits, dass die für Autoimmunität prädisponierenden IL-7R α -Genotypen die Rate des IL-7R α -mRNA-*Splicings* erhöhten [139, 144], was in gesteigerten sIL-7R-Levels resultierte [136, 145]. Dies kann potenziell mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Autoimmunität assoziiert werden [76]. Andererseits wurden auch niedrigere sIL-7R α -Serumlevel bei T1D-Patienten mit dem Risiko-Haplotyp (rs1494555G) im Vergleich zum Referenz-Haplotyp beschrieben [140]. Zudem können die Haplotypen einen Einfluss auf die mIL-7R α -Expression haben. Jäger et al. zeigten, dass das Verhältnis der Expression des membranständigen zum löslichen IL-7R α bei Trägern protektiver Haplotypen erhöht und bei Trägern von Risiko-Haplotypen erniedrigt ist [137]. Darüber hinaus existiert ein wichtiger Polymorphismus im Exon 6 (T244I) zwischen der Transmembran- und Extrazellulär-Domäne, welcher mit Autoimmunerkrankungen wie dem T1D assoziiert ist [138].

Der Einfluss des Zytokins IL-7 auf die Genexpression in An- und Abwesenheit einer T-Zell Aktivierung wurde ebenfalls untersucht. IL-7 allein induzierte eine unterschiedliche Expression von einer kleinen Gen-Gruppe: Hierzu gehört die Hochregulation der Expression der -auf die IL-7 Signaltransduktion- regulatorisch wirkenden Moleküle SOCS1, SOCS2 (*suppressor of cytokine signalling*) und CISH (*cytokine induced SH2 domain protein*) [137, 146] sowie des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) [137]. Einige Gene wurden ausschließlich in den mit IL-7 inkubierten Proben exprimiert. Daher scheint IL-7 ein T-Zell-Profil hervorzurufen, das dem charakteristischen Profil des T1D ähnelt. (Absatz [124])

IL-7/IL-7R beim humanen T1D: sIL-7R

Der IL-7R-Signalweg wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, hierzu gehören die Expression des membranständigen IL-7R α sowie die Freisetzung der löslichen IL-7R α -Variante (sIL-7R α) [77]. Der sIL-7R α wird durch die Exklusion des Exons 6 gebildet [147], sodass IL-7R α -Ketten-Monomere ohne die Transmembran- und intrazelluläre Domäne gebildet werden [148]. Es wird spekuliert, dass der sIL-7R α als ein Reservoir für IL-7 dienen und dessen Bioaktivität steigern könnte [143]. Ob ihm eine agonistische oder antagonistische Rolle in Bezug auf die IL-7-Bioverfügbarkeit zukommt, ist umstritten [127]. Studien beschrieben eine signifikant moderate bis keine Assoziation zwischen dem sIL-7R α und IL-7 [141, 149] bzw. eine fehlende Korrelation [140, 150] und beide Parameter scheinen aufgrund unterschiedlicher Expression im T1D-Krankheitsverlauf auf verschiedene Weise reguliert zu werden [141]. In diesem Zusammenhang beschrieben Hoffmann et al. erhöhte sIL-7R Serumkonzentrationen bei T1D-Erkrankungsbeginn und signifikant gesunkene Level während einer therapeutischen Behandlung, wohingegen IL-7 nur in Langzeit-T1D Patienten, im Gegensatz zu Kontrollen, erhöht gewesen ist. Es wurden mehrere genetische und krankheitsassoziierte Faktoren beschrieben, welche die sIL-7R-Level, jedoch nicht die IL-7-Spiegel, in der untersuchten T1D-Kohorte beeinflussten. IL-7 ist hingegen hauptsächlich mit dem sIL-7R assoziiert gewesen. (Absatz [141]). Daneben scheint der sIL-7R α eine hemmende Wirkung auf das IL-7-Signalling auszuüben, indem er mit dem mIL-7R α um IL-7 konkurriert. Diesbezüglich stellten Jäger et al. dar, dass hohe sIL-7R α -Level die IL-7-vermittelte STAT5-Phosphorylierung in CD4+-T-Zellen signifikant senken [137].

IL-7/IL-7R beim humanen T1D: mIL-7R-Expression

Wie bereits erwähnt, wird der IL-7-Signalweg u. a. durch die Expression des membranösen IL-7R reguliert. In Voruntersuchungen meiner Arbeitsgruppe wurde die Expression des mIL-7R α beim T1D bereits mehrfach und unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Grundhypothese meiner Arbeit basiert auf Daten von Seyfarth et al., welche eine signifikant vermehrte IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen, insbesondere auf T-Gedächtniszellen mit einer hohen allgemeinen Gamma-Ketten-Expression, in T1D-Patienten im Vergleich zu Kontrollen beschrieben ($p = 0,006$) [151]. Weiterhin hat meine Arbeitsgruppe die IL-7R α -Expression – u. a. in der von mir für die Gewinnung der Serumproben verwendeten Studienkohorte – im Rahmen der STOP-T1D-Studie untersucht. Hierbei konnte die oben beschriebene, erhöhte IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen in T1D-Patienten, verglichen mit gesunden Kontrollen, in verschiedenen Kohorten bestätigt werden (D: $p = 0,0259$). Eine signifikant erhöhte Expression konnte auch auf CD8+ T-Zellen beobachtet werden (D: $p = 0,0002$) (unveröffentlichte Daten aus der STOP-T1D-Studie in Deutschland (D) und Ghana). Die Ursache für die beschriebene, vermehrte Expression des IL-7R α ist unklar. Bekannt ist jedoch, dass seine Expression stark reguliert und von Serumfaktoren beeinflusst wird, was in den nächsten beiden Abschnitten ersichtlich wird. Daher könnte das T1D-Serum, welches sich vom Serum gesunder Kontrollen unterscheidet, für die vermehrte IL-7R α -Expression verantwortlich sein.

1.3.3 Regulation der Expression des membranösen IL-7R

Die starke Regulation der Expression des membranständigen IL-7R α erfolgt auf mehreren Ebenen. Zu Beginn ist die transkriptionelle Regulation zu nennen. Die Oberflächenexpression des IL-7R α -Gens wird durch Transkriptionsfaktoren gesteuert. Die Ets-Transkriptionsfaktoren sind die Hauptregulatoren der IL-7R α -Expression in den verschiedenen lymphoiden Linien. Hierzu gehören PU.1 (nur in der B-Zell-Linie), das GA-Bindeprotein und Ets-1 [83, 154, 155], welche an den Promotor des IL-7R-Gens binden und dessen Aktivität beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass das GA-Bindeprotein essenziell für die IL-7R α -Expression in Thymozyten und Ets-1 in peripheren T-Zellen ist [83, 154]. Letztere

steigern die Expression, wohingegen GFI-1 (*growth-factor independent 1*) eine hemmende Wirkung ausübt [83, 87, 154]. Hierdurch wird die Sensibilität der Zelle gegenüber IL-7 moduliert. Es gibt zahlreiche verschiedene Stimuli, welche diese Transkriptionsfaktoren aktivieren und zur Steigerung der IL-7R α -Expression führen können. Zu diesen gehören die Typ-1-Interferone (u. a. IFN α und IFN β), TNF und Glukokortikoide [87, 156]. Weiterhin aktiviert das Zytokin IL-7 auf Transkriptebene zwei Arten von negativem Feedback: Zum einen wird der IL-7R-Signalinhibitor SOCS-1 und zum anderen der Transkriptionsrepressor GFI-1 aktiviert, wodurch die IL-7R α -Signalkaskade bzw. -Expression inhibiert wird [87, 157]. Zudem können Mutationen im IL-7R-Gen die Rezeptor-Expression und -Aktivität beeinflussen und das Risiko für Autoimmunerkrankungen bzw. Immundefekte erhöhen [92, 158]. Auf posttranskriptioneller Ebene können alternative Spleißvorgänge der IL-7R α -prä-mRNA zur Bildung von sowohl membranösen als auch löslichen Rezeptorvarianten [148] führen. Einige dieser Varianten sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung autoimmuner Erkrankungen assoziiert [143, 159]. Die lösliche Isoform (sIL-7R) bindet ebenfalls IL-7 und moduliert somit die Signalübertragung über den membranösen Rezeptor. Phosphorylierungen [160] und posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen haben einen Einfluss auf die Stabilität und Funktion des IL-7R α , indem sie die Interaktion mit Liganden und intrazellulären Signalmolekülen beeinflussen. Beispielsweise bindet IL-7 300-fach stärker an den glykosylierten IL-7R α als an die nicht-glykosylierte Form [111]. Des Weiteren führt die Bindung von IL-7 auf Proteinebene zur rascheren Internalisierung des IL-7R mit anschließender Degradierung in Proteasomen bzw. Lysosomen oder reduziertem *Recycling* zurück an die Zelloberfläche [93]. Bei fehlendem IL-7-*Signalling* wird die IL-7R α -Oberflächenexpression durch Ephrine reguliert, welche direkt mit dem Rezeptor interagieren und ihn stabilisieren [161] bzw. dessen Internalisierung verzögern können [162]. Bei der Regulation der Expression des IL-7R können Serumfaktoren, wie anhand des Zytokins IL-7 bereits angedeutet, auf verschiedenen Ebenen eine Rolle spielen.

1.4 Serumfaktoren beim Typ-1-Diabetes

1.4.1 Inflammatorische Zytokine und weitere Faktoren

Die Expression des membranständigen IL-7R wird stark reguliert, wie bereits oben erwähnt. Serumfaktoren, wie z. B. Zytokine, können die Transkription, Translation und Rezeptorstabilität beeinflussen sowie den IL-7R-Signalweg modulieren. Zytokine sind kleine Proteine, die von einer Zelle ausgeschüttet werden und die Zelle selbst (autokrine Aktivität) oder eine andere Zelle (parakrine Aktivität) strukturell sowie funktionell verändern können [32]. Zu den Zytokinen gehören Interferone, Interleukine und Wachstumsfaktoren [32]. T-Zell-Zytokine werden häufig als Interleukine bezeichnet und mit einer Zahl versehen. Die meisten löslichen Zytokine wirken lokal und gemeinsam mit membranständigen Effektor-Molekülen [32]. Die jeweiligen Rollen der einzelnen Zytokine sind bislang nicht vollständig verstanden; nur vereinzelt haben Zytokine eindeutig entweder pro- oder antiinflammatorische Eigenschaften, häufig ist die Wirkung kontextabhängig.

Bei der Regulation des membranösen IL-7R handelt es sich beim Zytokin IL-7 sowie dem sIL-7R um Schlüsselfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Serumfaktoren beim T1D verändert sind. Studien beschrieben, dass neu diagnostizierte T1D-Patienten höhere sIL-7R Serumkonzentrationen aufweisen [135], welche unter einer Therapie sinken [141]. Zudem wiesen (Langzeit-)T1D-Patienten höhere IL-7-Serumkonzentrationen im Gegensatz zu gesunden Kontrollen auf [141, 163]. Seyfarth et al. beschrieben, dass junge T1D-Patienten mit dem protektiven Haplotyp niedrigere IL-7-Serumspiegel sowie den niedrigsten sIL-7R-Spiegel im Vergleich zum Referenz- und Risiko-Haplotyp zeigten [140]. Folglich können diese Veränderungen einen Einfluss auf die Regulation des membranösen IL-7R haben.

Neben IL-7 unterdrücken auch die überlebensfördernden Zytokine IL-2, IL-4, IL-15 (Mitglieder der *common gamma chain*-Familie) und IL-6 die IL-7R α -Transkription [87, 164]. Chen et al. fassten in einem Review zusammen [165], dass Studien die IL-6-Serumspiegel in T1D-Patienten sowohl als signifikant höher [163, 166, 167] als auch ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben [168, 169]. T1D-Patienten zeigten zudem erniedrigte IL-4-Plasmalevel [170] und signifikant erhöhte IL-15-Serumlevel [171].

Weiterhin reguliert das proinflammatorische Zytokin TNF- α die Expression des IL-7R signifikant hoch [87], wobei in T1D-Patienten sowohl erhöhte [163, 172, 173] als auch signifikant erniedrigte TNF- α -Spiegel [170] beschrieben worden sind. Einen minimalen Einfluss auf die Oberflächenexpression des IL-7R haben zudem IL-9 und INF- γ [87]. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollen waren die INF- γ -Serumkonzentrationen in T1D-Patienten (ohne Remission) erhöht [163, 174].

Daher spielen proinflammatorische Zytokine als Serumfaktoren eine übergeordnete Rolle beim T1D und beeinflussen auf verschiedene Art und Weise die T1D-Pathogenese. Hinweisend hierfür ist, dass proinflammatorische Zytokine beim T1D nicht nur veränderte Serumspiegel aufweisen, sondern teilweise auch mit der T1D-Entwicklung korrelieren [165].

1.4.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Anti-inflammatorische Zytokine werden von einer Vielzahl von Immunzellen wie z. B. T_{regs} sezerniert. Die suppressorischen Zytokine wie IL-2, IL-10 und TGF- β dienen der Aufrechterhaltung sowie Wiederherstellung der immunologischen Toleranz [175-178] und wirken hierdurch schützend auf Beta-Zellen.

Bei T1D-Patienten wurden niedrigere TGF- β -Serumlevel beobachtet, insbesondere bei Langzeit-Patienten [179]. Dieses Zytokin hemmt die IL-7-induzierte Proliferation von T-Gedächtniszellen [180] und bezogen auf den IL-7R scheint es die Expression zu fördern [181].

Das Zytokin IL-10 wird von einer Vielzahl an Zellen, u. a. T-Zellen, produziert und hat auf die lymphoide Zelllinie einen inhibitorischen Effekt [178]. Kikodze et al. entdeckten signifikant niedrigere IL-10-Plasmaspiegel in T1D-Patienten [170]. Ein direkter Einfluss auf den IL-7R ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

Weiterhin ist IL-2, welches als Wachstumsfaktor für T_{regs} fungiert, in der Lage die IL-7R-Expression über den PI3K/Akt-Signalweg zu reduzieren [164]. Bei T1D-Patienten wurden erhöhte IL-2R α -Serumspiegel beschrieben, wodurch der IL-2-Signalweg möglicherweise

dysreguliert wird [163] und somit die Expression des membranständigen IL-7R beeinflusst werden könnte.

Die beschriebenen zahlreichen Zytokin-Verschiebungen im Serum von T1D-Patienten bilden vermutlich ein pathologisches Serum-Profil, welches den Phänotyp und die Funktion der T-Zellen beeinflusst. Folglich ist ein Screening-Assay, der die Auswirkungen eines solchen Serum-Profils auf den T-Zell-Phänotyp untersucht, erstrebenswert.

Als methodische Grundlage hierfür dient der bereits etablierte Serum-Assay von Kleinhenz et al., welche eine signifikante Unterdrückung der Lymphozyten-Antwort auf gereinigte Proteinderivate durch Plasma von Tuberkulose-Patienten im Gegensatz zum Plasma gesunder Kontrollen beobachtet haben [182]. Dieser *in vitro* Serum-Assay kann dazu genutzt werden, den Einfluss von Patienten-Serum/-Plasma bzw. dessen Faktoren auf Referenz-Zellen zu untersuchen. Dabei können unterschiedliche Aspekte, wie z. B. der Einfluss auf den *in vitro*-Phänotyp (u. a. Expression von verschiedenen Oberflächenmerkmalen, Häufigkeitsverteilung von *Subsets*) oder die Funktion (z. B. Signalübertragung, Zytokinausschüttung) der untersuchten Zellpopulation, analysiert werden. Zudem kann der Einfluss von Serum auf eine stimulierte Zellantwort untersucht werden. Es ist auch möglich, die Serumproben vor und nach einer Zellkultur auf ihre Faktoren hin zu untersuchen, um das Serum-Profil zu beschreiben. Hierdurch können sich auch potenzielle Biomarker für die Diagnose und Prognose von Erkrankungen identifizieren lassen. Hierfür können je nach Fragestellung gepoolte oder einzelne Serumproben von gesunden bzw. erkrankten Spendern (Patienten) verwendet und der Einfluss auf die jeweilige Referenz-Zellpopulation miteinander verglichen werden. Von besonderem Interesse sind die Zellen des Immunsystems, welche auf zirkulierende Serumfaktoren bzw. Signale aus dem Serum reagieren und zur Pathogenese von z. B. Infektions- und Autoimmunerkrankungen beitragen. Daher wurde mithilfe dieses Serum-Assays der Einfluss auf insbesondere *PBMCs* und ihre Untergruppen wie z. B. Monozyten und Lymphozyten untersucht. Dabei wird die, aus gesundem Spenderblut isolierte, Referenz-Zellpopulation mit den Serumproben für eine bestimmte Dauer kultiviert, wobei die *in vitro* Lebensdauer der Zellpopulation berücksichtigt werden sollte.

Dieser Serum-Assay eignet sich daher gut für meine Arbeit mit T-Zellen und T1D-Patientenseren. Denn mithilfe des Serum-Assays können diejenigen Aspekte untersucht werden, die für die Beantwortung meiner Fragestellung von Interesse sind. Wir nutzten folglich einen an unsere Zellpopulation und Fragestellung modifizierten Serum-Assay. Im Gegensatz zur Methodik von Kleinhenz et al. verwendeten wir individuelle, *gematchte*, nicht hitze-inaktivierte Serumproben statt hitze-inaktiviertem, *gepooltem* Plasma, um die Wirkung von T1D-Patientenserum auf Referenz-T-Zellen zu untersuchen und den Einfluss in der Patienten- und Kontrollserumgruppe miteinander vergleichen zu können. Eine Hitzeinaktivierung zur Reduktion störender Komponenten wurde nicht durchgeführt, da hierdurch die für uns relevanten Serumfaktoren in ihrer Konzentration gemindert werden könnten.

1.5 Ziele der Arbeit

Beim T1D sind sowohl Veränderungen des Serummilieus als auch des T-Zell-Phänotyps beschrieben worden. Untersuchungen zeigten eine erhöhte Expression des IL-7R α auf CD4⁺-T-Zellen von T1D-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen [151]. Auch Serumveränderungen wurden beim T1D beobachtet, wobei insbesondere erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen im Serum von T1D-Patienten beobachtet wurden. Es bleibt jedoch unklar, ob und wie T1D-Serumfaktoren die veränderte IL-7R α -Expression beeinflussen. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Serumproben von T1D-Patienten auf das Expressionsniveau des IL-7R α zu analysieren.

Mithilfe des beschriebenen in vitro Serum-Assays sollte der Einfluss von Serumproben von T1D-Patienten und immunologisch gesunden Kontrollen auf Referenz-T-Zellen untersucht werden und mit bereits beschriebenen Veränderungen des T-Zell-Phänotyps in T1D-Patienten verglichen werden. Der Fokus lag hier insbesondere auf den Auswirkungen der vermutlich pathologischen T1D-Serum-Profile auf die IL-7R α -Expression. Hierfür wurden mittels Serumproben von je 30 Kindern und Jugendlichen mit Typ-1-Diabetes bzw. alters- und geschlechtsgematchten, gesunden Kontrollen sogenannte ex vivo Phänotypisierungen und in vitro Kulturexperimente an Referenz-T-Zellen durchgeführt. Dabei sollten krankheitsassoziierte Veränderungen an den Referenz-T-Zellen, möglicherweise

hervorgerufen durch ein pathologisches T1D-Serummilieu, durchflusszytometrisch untersucht werden. Analysiert wurden dabei unter anderem die IL-7R α -Expressionslevel (CD127) und die Häufigkeiten der T-Zell-*Subsets* mittels des Differenzierungs-Gedächtnis-Status (CCR7, CD45RO/A). Des Weiteren wurden phänotypische Oberflächenmarker mit seruminduzierter STAT-Signaltransduktion korreliert, um potenzielle Zusammenhänge abzubilden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer LSRFortessa™	BD Biosciences, San José
Eismaschine/Flockeneisbereiter RF0266/SPR 80W	Manitowoc Ice, Wisconsin
Flüssigstickstofftank Biosafe MD (Weithals)	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen (Sieg)
Gefrierschrank –20 °C (Comfort/ Premium)	LIEBHERR, Bulle
Inkubator HERAcell VIOS 160i	ThermoFisher Scientific, Waltham
Inverses Mikroskop CK40	Olympus, Tokyo
Kühlschrank 4 °C (Comfort No Frost/ Premium)	LIEBHERR, Bulle
Magnet EasySep	STEMCELL Technologies, Köln
Pipettierhelfer Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Zizers
Research® Pipette 0,5-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank Thermo Heraeus HERAsafe HS18	Thermo Electron Corporation, Waltham
Tischzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen
Ultratiefkühlschrank –86 °C (TSX50086V)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Vortex-Schüttler peqTWIST	PEQLAB GmbH, Erlangen
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die im Folgenden aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden für die Versuchsdurchführung verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsartikel

Produkt	Hersteller
ART 1000 Reach Barrier Pipettenspitzen (1000 µl)	Thermo Scientific, Schwerte
Blutentnahme Röhrchen Li-Heparin (6 ml)	BD Biosciences, San José, Kalifornien
Cluster/ Mikroverdünnungs-Röhrchen mit Deckel und Gestell (1,2 ml)	Starlab, Hamburg
Deckgläser für Haemocytometer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Eppendorf Mikrozentrifugen-Röhrchen (0,5 - 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Polystyrol-Röhrchen, Rundboden (FACS-Röhrchen) (5 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Falcon Polystyrol-Röhrchen, Rundboden mit Deckel, steril (5 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Falcon Röhrchen (15/ 50 ml), Rundboden	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Handschuhe Nitril Micro-Touch®	Ansell, Richmond
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Thermo Scientific, Schwerte

Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Pipettenspitzen, steril (10 – 1000 µl), Filter/universal gesteckt	Starlab, Hamburg
Rotilabo Serologische Pipetten/ Stripetten, steril (5/ 10/ 25 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe
Serologische Pipetten Corning® Costar® Stripetten® (5/ 10/ 25 ml)	Corning Inc., New York
Vacutainer Nadelhalter (Adapter)	BD Biosciences, San José, Kalifornien
Vacutainer Safety-Lok Blutentnahmeset (21 G)	BD Biosciences, San José, Kalifornien
Vacutainer SST II Advance (Serumröhrchen)	BD Biosciences, San José, Kalifornien
Zellkultur-Platten U-Boden (96-wells)	Greiner Bio One, Kremsmünster

2.1.3 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Chemikalie	Hersteller
FACS Flow™/Rinse/Clean Solution	BD Biosciences, San José, Kalifornien
Histopaque - 1077 Hybri Max (Ficoll)	Sigma-Aldrich, St. Louis

Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
TRIS EDTA Puffer Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis
True-Nuclear™ 4X Fix-Konzentrat	BioLegend, San Diego
True-Nuclear™ Fix-Verdünnungsmittel	BioLegend, San Diego
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.4 Medien und Zellkulturbestandteile

Tabelle 4: Verwendete Medien

Komponente	Bezugsquelle
DMSO-Zell-Einfriermedium	Sigma-Aldrich, St. Louis
DPBS – <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>	Thermo Scientific, Schwerte
GIBCO Fetales Kälberserum (FBS), qualifiziert, Herkunft: Brasilien	Thermo Scientific, Schwerte
HEPES Buffer (1 M)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Humanes Serum, männlich, AB Plasma, hitzeinaktiviert, steril gefiltert, Herkunft: USA	Sigma-Aldrich, St. Louis
L-Glutamin-Lösung, 200 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis
RPMI 1640 Medium, ohne Glutamin	Thermo Scientific, Schwerte
X-Vivo Medium	Lonza Group AG, Basel

Tabelle 5: Zusammensetzung des T-Zell-Isolationsmediums

Bestandteile	Konzentrationen
EDTA	0,2 %
Fetales Kälberserum	2 %
PBS	97,8 %

PBS = *Phosphate Buffered Saline*. EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure.

Tabelle 6: Zusammensetzung des RPMI-Basismediums

Bestandteile	Konzentrationen
L-Glutamin	1 %
Hepes	1 %
RPMI 1640	88 %
(Humanes Serum	10 %)

Das jeweilige humane Serum (10 % des Gesamtvolumens) der Patienten bzw. Kontrollen wird anschließend zum RPMI-Basismedium hinzugefügt. Hepes = 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure. RPMI: Zellkulturmedium.

2.1.5 Antikörper

Tabelle 7: Humanreaktive Antikörper

Antikörper human	Klon	Konjugat	Kennzeichnung	Menge in µl
Oberflächenmarker-Panel				
CD3	5K7	AF700	BioLegend (344822)	0,2
CD4	OKT4	BV510	BioLegend (317444)	0,5

CD5	L17F12	BV605	BioLegend (364020)	0,2
CD8a	HIT8a	FITC	BioLegend (300906)	0,2
CD25	BC96	BV421	BioLegend (302630)	0,2
CD27	M-T271	PerCP-Cy5.5	BioLegend (356408)	0,2
CD45RA	HI100	APC	BioLegend (304112)	0,05
CD69	FN50	BV605	BD Biosciences (562989)	0,2
CD95 (Fas)	DX2	BV650	BioLegend (305642)	0,1
CD127 (IL-7R α)	A019D5	PE-Cy7	BioLegend (351320)	0,2
CD197/CCR7	G043H7	PE	BioLegend (353203)	0,1
HLA-DR	L243	PE-Dazzle 594	BioLegend (307654)	0,05/0,1
<i>Viability dye 1 : 100</i>	-	e780	eBioscience (65-0865-14)	0,5
pSTAT				
Anti-Hu Phospho-STAT1 (Tyr701)	KIKS10803	PE-Cy7	invitrogen (25-9008-42)	0,3
Anti-Hu/Mo Phospho- STAT3 (Tyr705)	LUVNKLA	APC	invitrogen (17-9033-42)	0,5
Anti-Hu/Mo Phospho- STAT5 (Tyr694)	SRBCZX	PE	invitrogen (12-9010-42)	0,5

HLA-DR	L243	PerCP-Cy5.5	BioLegend (307630)	0,5
--------	------	-------------	-----------------------	-----

Übersicht der verwendeten humanreaktiven Antikörper zur Bestimmung der T-Zellphänotypen (*Panel 2*) und zur Untersuchung der T-Zell-Funktion (pSTAT) inklusive Angabe des assoziierten Fluorochroms, des Klons, der verwendeten Menge je *Well* und der Bestell-/Referenznummer. CD= *Cluster of Differentiation*.

2.1.6 Kits & Stimulanzen

Tabelle 8: Verwendete Kits und Stimulanzen

Produkt	Hersteller
EasySep humanes CD4+-T-Zell-Isolations-Kit	STEMCELL TECHNOLOGY (17952)

CD = *Cluster of Differentiation*.

2.1.7 Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Software	Hersteller
EndNote v. 20	Adept Scientific, Frankfurt
FacsDiva™ v. 9.0	BD Biosciences, San José, Kalifornien
FlowJo® v. 10.8.1	BD Biosciences, San José, Kalifornien
GraphPad PRISM v. 9	GraphPad Software, Inc., Kalifornien
Microsoft Office 365 v. 2304	Microsoft Corporation, Redmond
Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond

Für die Durchführung der Analyse und zur Grafikdarstellung benötigte *Software*.

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Das vorliegende Dissertationsprojekt basiert auf einer klinisch-experimentellen Datenerhebung im Sinne einer Querschnittsstudie, welche an der Klinik für allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt wurde. Das Ziel der Studie war es, mittels Seruminkubation von T-Zellen und anschließender Zellanalyse, Oberflächen- und Funktionsmarker zu messen. Das Studienkollektiv besteht aus Kindern und Jugendlichen mit bzw. ohne T1D (n = 60). Bei diesen handelt es sich um Studienteilnehmer der STOP-T1D Studie, welche von PD Dr. med. Julia Seyfarth durchgeführt wird. Diese wurden im Zeitraum vom 25.08.2021 bis zum 08.06.2022 rekrutiert. Die verwendeten 60 Serumproben wurden aus dem Vollblut dieser Teilnehmer gewonnen.

2.2.2 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv besteht aus einer Kohorte von immunologisch-gesunden Kontrollen (n = 30) sowie Typ-1-Diabetes-Patientinnen und -Patienten (n = 30). Die gesunden Kontrollen stammen aus Hypercholesterinämie-Sprechstunden der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Diese wurden bei Erfüllung der Aufnahmekriterien in die Studie eingeschlossen. Hierzu zählen ein guter Allgemeinzustand, eine negative Anamnese für die Erkrankung an Typ-1-Diabetes mellitus in der Familie ersten Grades und das Fehlen von Autoimmunerkrankungen sowie chronisch-infektiösen bzw. tumorösen Erkrankungen beim Studienteilnehmer. Die T1D-Patienten wurden während der Diabetes-Sprechstunden bzw. stationär rekrutiert. Für den experimentellen Versuch wurden lediglich Langzeit-T1D-Patienten ausgewählt, d. h. solche mit einer mindestens einjährigen Erkrankungsdauer. Die Blutentnahme erfolgte aus ethischen Gründen im Rahmen der ohnehin notwendigen Routine-Blutuntersuchung der Kinder bzw. Jugendlichen im nüchternen Zustand, bei welcher maximal 19 ml Blut zu Studienzwecken abgenommen wurden (2 × Li-Heparin Röhrchen 6 ml, 1 × Serum-Röhrchen 3,5 ml, 1 × RNA-Röhrchen 3 ml). Zum Patientenwohl wurde maximal 3 ml Blut pro Kilogramm Körpergewicht entnommen. Ferner wurden insgesamt drei *Buffy Coats* unterschiedlicher Individuen verwendet, welche von der Blutspendezentrale des UKD bezogen wurden.

Positive Ethikvoten der Ethikkommission der Universität Düsseldorf für die Verwendung von Patientenproben (Ethikvotum 2019-423-KFogU, Charakterisierung der T-Zell-Aktivierung und Zytokinantwort bei Patienten mit Typ-1-Diabetes) sowie von *Buffy Coats* aus der Blutspendezentrale (Ethikvotum 5445) lagen vor Studienbeginn vor. Die Weitergabe der *Buffy Coats* erfolgte anonymisiert. Hiermit wird darauf hingewiesen, dass die Studie die Richtlinien der Deklaration von Helsinki (2004) eingehalten hat.

Die Studienteilnehmer bzw. stellvertretend die Eltern wurden über den Studienzweck und -ablauf informiert und sowohl über potenzielle Risiken als auch über ihr Recht, die Teilnahme ohne negative Auswirkungen jederzeit zu widerrufen, aufgeklärt und ihr Einverständnis wurde schriftlich dokumentiert. Ab einem Alter von 14 Jahren wurde zusätzlich das Einverständnis der Kinder eingeholt und berücksichtigt.

2.2.3 Versuchsaufbau

Um den Einfluss von Serum auf die IL-7R α -Expression von T-Zellen zu untersuchen, wurden Referenz-T-Zellen sowie je 30 Patienten- und Kontrollseren benötigt. Es handelte sich um Seren, welche aus der T1D-Studie stammen (s. o.) und im -80°C -Gefrierschrank aufbewahrt wurden. Die Auswahl der Patientenproben erfolgte nach ausgewählten klinischen Kriterien (siehe Abschnitt Studienkollektiv). Die Kontrollproben wurden in Bezug auf Alter und Geschlecht mit den Patientenproben *gematcht*. Ziel war es, die Gruppen so zu matchen, dass sich ein vergleichbarer Median je Parameter (Alter bei Rekrutierung und BMI-Perzentile) ergibt (s. Abb. 4a und 4b).

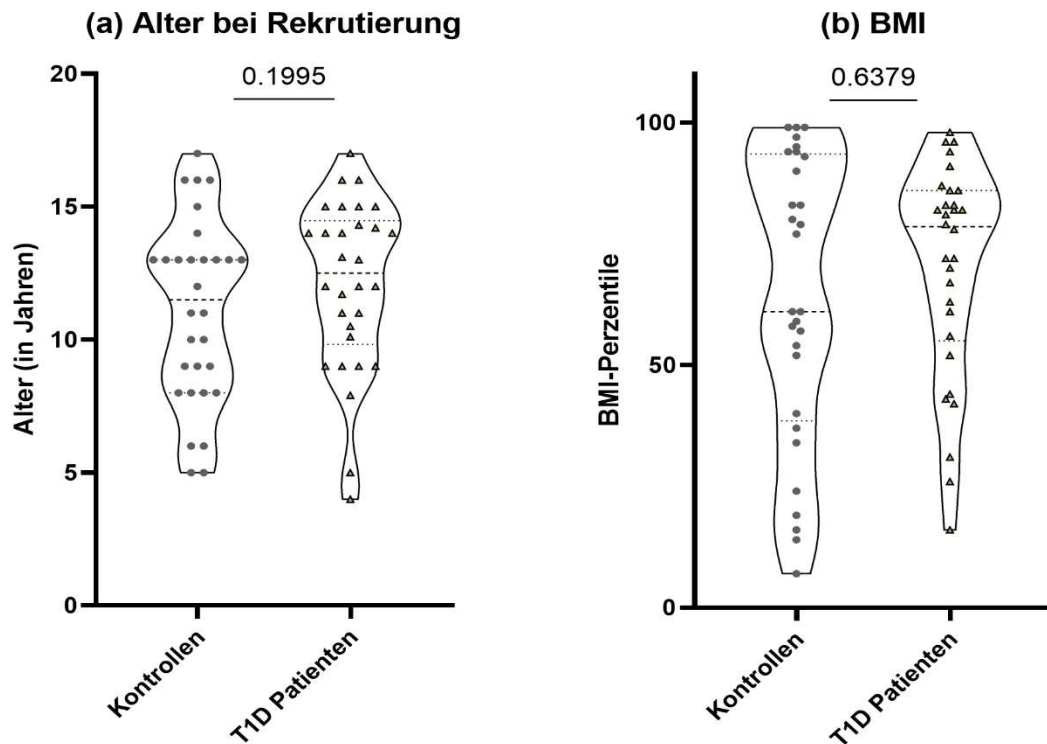


Abb. 1: Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppen-Charakteristika

Dargestellt wird die Verteilung des Alters in Jahren bei Rekrutierung (a) sowie die Verteilung der BMI-Perzentile (b) für jeweils die T1D-Patienten- und Kontrollgruppe. Die Darstellung in Form von *Violin-Plots* zeigt den Median (dicke gestrichelte Linie), die Quartile (dünne gestrichelte Linie) sowie das Minimum und Maximum (oberes und unteres Ende). Die Kontrollen (dunkelgraue Punkte) und Patienten (goldene Dreiecke) werden als Einzelwerte dargestellt. BMI= *Body Mass Index*. Angabe des p-Wertes über horizontalem Strich (Mann-Whitney-U Test).

Das Studiendesign (siehe Abb. 1) sah eine Zellkulturphase von einem bzw. drei Tagen auf 96-*Well-U-Bottom*-Platten in RPMI-Medium, L-Glutamin (1 %), Hepes (1 %) sowie 10-prozentigem Serum der T1D-Patienten bzw. Kontrollen vor. Die T-Zell-Suspension wurde also für ca. 16 Stunden (Kurzzeit-Inkubation) bzw. für ca. 64 h (Langzeit-Inkubation) inkubiert.

Zusätzlich verwendeten wir zwei interexperimentelle Kontrollen: Dabei handelte es sich einerseits um ein erworbenes, normalisiertes humanes Serum (hitze-inaktiviert) und andererseits um ein Serum eines hausinternen Spenders, welche sich als Referenz in jedem Versuchsansatz befanden, um den Einfluss variierender Bedingungen beurteilen zu können.

Nach der Inkubationszeit sollten sowohl der Phänotyp als auch die Funktion der T-Zellen, dazu gehören insbesondere die pSTAT-Moleküle, durchflusszytometrisch gemessen werden. Dafür wurden die kultivierten Zellen mit drei verschiedenen *Panels* – unter Verwendung von mit Farbstoffen konjugierten Antikörpern – gefärbt, welche sich gegen Oberflächenmarker sowie intrazelluläre pSTAT-Moleküle richten. Die antikörperbasierten Färbungen geben somit – nach Messung mittels Durchflusszytometrie – Rückschlüsse auf den Phänotyp sowie die Funktion der T-Zellen. Die Rohdaten wurden schließlich analysiert und graphisch aufbereitet.

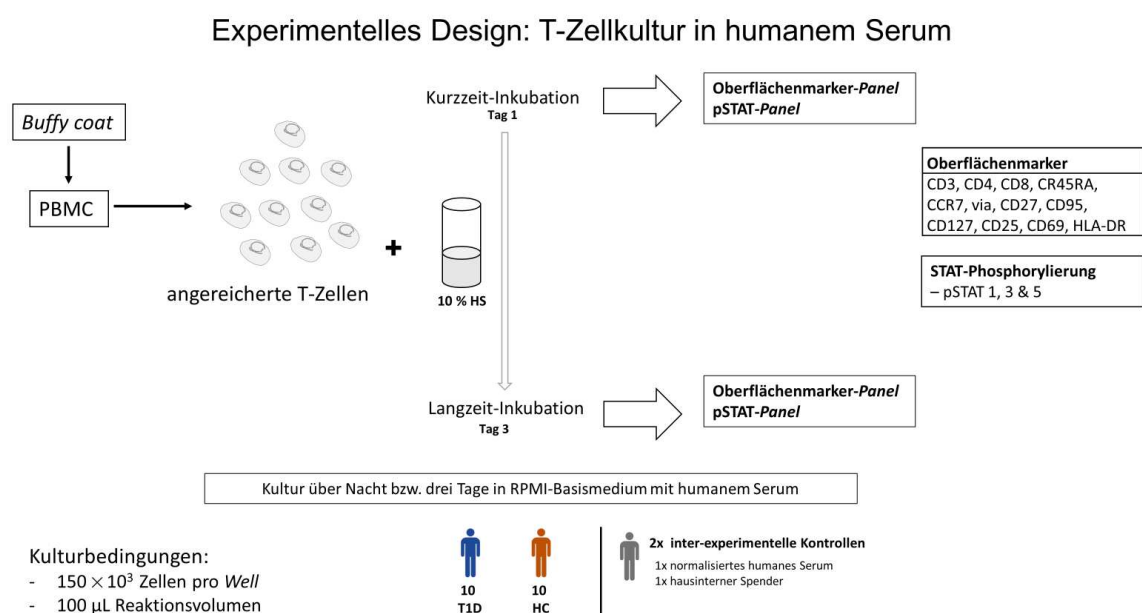


Abb. 2: Graphische Darstellung des experimentellen Designs

Isolation von PBMCs aus einem *Buffy Coat*. Anreicherung von CD4+-T-Zellen aus den PBMCs. Anschließend Kurz- oder Langzeitinkubation in RPMI-Basismedium und 10-prozentigem humanem Serum. Dann Färbung der Zellen mit antikörper-konjugierten Fluoreszenzfarbstoffen. Zudem werden die Kulturbedingungen, die verwendeten Kontrollen sowie die jeweilige *Panel*-Zusammensetzung beschrieben.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolation humaner T-Zellen aus dem peripheren Vollblut

Die verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch mit Bacillol gereinigt und desinfiziert. Alle Arbeiten, die Sterilität voraussetzen, wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Beschreibung der Methoden basiert auf Laborprotokollen.

Es wurden *Buffy Coats* verwendet, da diese reich an Leukozyten sind und sich daher für die Versuchsdurchführung eignen. Aus Gründen der Praktikabilität wurden drei individuelle *Buffy Coats* verwendet (*Buffy Coat* 1-3). Mit PBS verdünntem, heparinisiertem Vollblut (Verhältnis von 1:1) der Blutspendezentrale wurden zunächst mit Hilfe der Ficoll-Trennlösung nach Herstellerangaben mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert. Hierfür wurde das Blut-PBS-Gemisch vorsichtig auf die Ficoll-Phase geschichtet und für 30 Minuten zentrifugiert (bei 22 °C, 1500 rpm, Zentrifugenbremse: 1). Nach Entnahme der Röhrchen ließen sich mehrere Schichten erkennen: Die unterste, rote Schicht wird von den Erythrozyten und Granulozyten gebildet, gefolgt vom klaren Ficoll, dem grauen PBMC- und Thrombozytenring und schließlich dem gelblich erscheinenden Plasma. Ab diesem Zeitpunkt wurde auf Eis gearbeitet und kaltes PBS verwendet.

Die PBMC wurden vorsichtig entnommen und mehrmals gewaschen. Für den ersten Waschschrift wurden die PBMC in ein mit PBS gefülltes Röhrchen überführt, welches dann mit weiterem PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Dann wurden die Zellen 15 Minuten lang zentrifugiert (4 °C; 1200 rpm; Bremse: 9) und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden anschließend in PBS resuspendiert, auf 10 ml aufgefüllt, und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand erneut entfernt und die Zellen in einem Milliliter PBS resuspendiert, um anschließend gezählt zu werden.

Für die Zellzählung wurde die Zell-PBS-Mischung mit Trypanblau-Lösung (1 : 10 Trypanblau in PBS) vermischt (Verhältnis 1 : 40) und in einer Zählkammer nach Neubauer (vier Quadranten) lichtmikroskopisch ausgezählt. Der Farbstoff wird von den avitalen Zellen aufgenommen, sodass sich diese blau angefärbt darstellen und eine Abgrenzung zu den vitalen Zellen erlauben.

Für die Anreicherung von CD4-positiven T-Zellen wurden pro Isolation 50×10^6 PBMCs in ein 15-ml-Ficoll-Röhrchen überführt, für 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden 500 µl vom T-Zell-Isolationsmedium (siehe Tabelle 5) hinzugefügt und gut mit dem Zellpellet vermischt. Die Zell-Medium-Suspension wurde in ein FACS-Röhrchen transferiert. Anschließend wurde das EasySep CD4+-T-Zell-Isolations-Kit (siehe Tabelle 8) nach Herstellerangaben verwendet. Diese Prozedur basiert auf immunomagnetischer negativer Selektion. Die unerwünschten Zellen werden zuerst von Antikörpern gebunden, welche mit den magnetischen Partikeln nach deren Zugabe gekoppelt werden. Dies ermöglicht die Selektion der Zellen von Interesse, denn die gebundenen Zellen wandern durch die magnetische Anziehungskraft an die Röhrchenwand, sodass der Überstand mit den gewünschten Zellen dekantiert werden kann. Demzufolge wurden die Zellen mit dem Selektionscocktail bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Dextran *RapidSpheres* gevortext, sodass sich die magnetischen Partikel gleichmäßig verteilen können. Dann wurden die Partikel zur Probe hinzugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde dann mit Isolationsmedium aufgefüllt und durchgemischt. Das Röhrchen wurde dann in den Magneten platziert und bei Raumtemperatur drei Minuten lang inkubiert. Letztlich wurde die angereicherte Zellsuspension in einem Schwung in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Darin befanden sich schließlich die isolierten CD4+-T-Zellen. Die Anzahl an Isolationen hängt ab von der benötigten T-Zellzahl bei einem durchschnittlichen Betrag von 30×10^6 CD4+-T-Zellen pro Isolation.

2.3.2 Kultivierung humaner T-Zellen

Serumgewinnung

Zur Gewinnung des Patientensерums wurde das Serumröhrchen nach Abwarten der Gerinnungszeit von mind. einer halben Stunde für 15 Minuten (bei 4 °C; 3000 rpm (Runden pro Minute); Zentrifugenbremse: 9) zentrifugiert und anschließend in *Cluster*-Röhrchen aliquotiert. Die Lagerung der Proben erfolgte im –80 °C-Gefrierschrank.

Durchführung der Kultur

Die isolierten Referenz-T-Zellen sollen mit den unterschiedlichen Seren für eine definierte Zeit auf 96-Well-Rundboden-Platten inkubiert werden. Das vorbereitete Standard-Kulturmedium bestand aus RPMI-Medium, L-Glutamin und HEPES. Anschließend wurde je Studienteilnehmer ein individuelles Kulturmedium hergestellt. Dazu wurde das Serum von je einem T1D-Patienten bzw. einer Kontrolle in einer Konzentration von 10 % zu je einem Ansatz hinzugefügt (ausführliche Zusammensetzung siehe Tabelle 6). Alle Messungen erfolgten in Duplikaten.

Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels vorbereitetem Kulturmedium gewaschen sowie konzentriert. Pro Well befanden sich 100 µl der Zell-Kulturmedium-Suspension, welche eine Zellzahl von ca. 150×10^3 beinhaltete. Die Zellkulturplatten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt für 16 Stunden (über Nacht; Untersuchung an Tag 1) beziehungsweise 64 h (drei Tage; Untersuchung an Tag 3) inkubiert.

2.4 Bestimmung von intrazellulären- und Oberflächenmarkern

2.4.1 Färbung der T-Zellen

Um die Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie zu untersuchen, bedarf es einer Färbung der Zellen. Dies geschieht mittels an Antikörpern konjugiertem Farbstoff. Die verwendeten spezifischen Antikörper bilden einen Immunkomplex, um die gewünschten Moleküle zu markieren. Die gekoppelten Fluorochrome fluoreszieren somit bei Beleuchtung durch die Laserstrahlen des Durchflusszytometers und werden durch dessen Detektoren detektiert. Hierdurch wird eine Charakterisierung des Phänotyps ermöglicht. Hierzu wurde ein Mastermix – ein sogenannter Antikörper-*Cocktail* – nach einem bestimmten Schema (*Panel*) zusammengestellt. Dieser setzte sich aus PBS und den Antikörpern zusammen. Der Materialliste (siehe Tabelle 7) ist zu entnehmen, wie die verwendeten *Panels* (Oberflächenmarker-*Panel* und pSTAT-*Panel*) im Einzelnen aufgebaut waren. Als Kontrolle wurde eine ex vivo Färbung durchgeführt, d. h., die Zellen wurden im unkultivierten Zustand an Tag 0 unmittelbar nach der Anreicherung gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden je *Panel* zwei *Wells* einer U-Boden-Platte mit einer Zellsuspension bestehend aus 1×10^5 T-Zellen (konzentriert in 100 µl) besät und bei 1200

rpm fünf Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurde der Antikörpermix pro *Well* hinzugefügt und resuspendiert. Die Platte wurde 30 Minuten lang vor Licht geschützt auf Eis gelagert, sodass die Antikörper sich an die entsprechenden Antigene binden konnten. Hiernach erfolgte die Zugabe von PBS und eine erneute Zentrifugation (1200 rpm; fünf Minuten bei 4 °C), um die Zellen zu waschen. Der Überstand wurde ein weiteres Mal entfernt und schließlich wurden 100 µl PBS zu den *Wells* hinzugefügt und die Zellen per Durchflusszytometrie gemessen.

Oberflächenfärbung nach Inkubationsphase

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen bei 1500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert (4 °C), der Überstand entfernt und die Zellen gewaschen. Hierzu wurde PBS hinzugefügt, erneut bei unveränderter Einstellung zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann wurden die Antikörper hinzugefügt und 30 Minuten lang auf Eis und lichtgeschützt inkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von PBS und eine Zentrifugation (1200 rpm; fünf Minuten bei 4 °C), um die Zellen zu waschen. Der Überstand wurde entfernt und der Waschvorgang wurde wiederholt. Dann wurden 100 µl PBS zu den *Wells* hinzugefügt, sodass die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgen konnte.

Intrazelluläre Färbung von phosphorylierten STAT-Molekülen

Die Färbung und Messung der intrazellulären Transkriptionsfaktoren pSTAT 1, 3 und 5 ist nach eintägiger Kultur erfolgt. Hierfür diente der *True Nuclear Fixationsbuffer* dazu, die Zellen zu fixieren, damit diese in ihrem aktuellen Zustand über einen längeren Zeitraum konserviert werden können. Der *Fixationsbuffer* besteht hauptsächlich aus Formaldehyd, einem chemischen Vernetzer, welcher die freien Aminogruppen der Proteine miteinander verbindet. Dabei können jedoch auch die Epitope von Interesse miteinander vernetzt werden, was die Bindung durch die komplementären Antikörper beeinträchtigen würde. Nach dessen Zugabe schloss sich eine 15-minütige Inkubationsphase (bei 37 °C, 5 % CO₂) und ein Waschschrift (1500 rpm für 5 Minuten bei 4 °C) an. Im Anschluss wurde eiskaltes Methanol, welches die Membranfluidität beeinflusst, hinzugefügt, um die Zellen zu permeabilisieren, sodass den Antikörpern die Bindung an die intrazytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird. Gleichzeitig fungiert Methanol (organisches Lösungsmittel) über Dehydrierung und Proteinausfällung ebenfalls als Fixativ. Die Platten

wurden erneut, wie oben erwähnt, inkubiert und behandelt. Dann erfolgte die zweimalige Durchführung eines Waschschruttes mittels 10%iger FBS (fetales bovines Serum)-enthaltender PBS-Lösung. Dann wurden die Zellen gefärbt und erneut zwei Mal gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 100 µl PBS pro *Well* aufgenommen und gemessen. Jeder graphisch dargestellte Einzelwert beschreibt den gemessenen MFI-Wert des IL-7Rα für je eine Probandenprobe (Well mit Referenz-T-Zellen, welches in dem humanen Serum eines Probanden inkubiert ist).

2.4.2 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können quantitative und qualitative Daten erhoben werden. Das Prinzip lässt sich folgendermaßen beschreiben: Eine einzelne Zelle passiert einen Laserstrahl und wird hierdurch gezählt. Die Passage erzeugt nämlich ein Signal, das in einen Puls umgewandelt und schließlich als Event gezählt wird. Die Größe und Granularität der Zelle beeinflussen hierbei die Lichtstreuung. Der *Forward Scatter* (FSC) gibt Auskunft über die Größe. Je größer die Zelle, desto mehr Licht wird refraktiert. Der *Sideward Scatter* (SSC) beschreibt die relative Komplexität, d. h. z. B. die Granularität und interne Strukturen. Darauf basierend werden die Zellen gezählt und in Populationen unterteilt. (Absatz [183])

Zusätzlich kann die Zelle mit Antikörper-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden. Fluorophore sind fluoreszente Marker und können die Expression von Zellmolekülen markieren. Eine Übersicht der hier verwendeten Antikörper mit ihrem Konjugat befindet sich in Tabelle 7. Monochromatische Laserstrahlen treffen auf einen Fluorophor, der typischerweise durch einen bestimmten Wellenlängenbereich angeregt wird. Diesen Bereich bezeichnet man als Absorptionsspektrum. Ein Teil dieser Energie wird als Wärme abgegeben. Das übrige abgegebene Licht wird in Form von Photonen abgegeben, ist langwelliger und erzeugt die Fluoreszenz (Emissionsspektrum). (Absatz [184])

Das emittierte Licht wird entsprechend der Wellenlänge durch verschiedene Kanäle weitergeleitet und von Detektoren erfasst. Die Spezifität der Detektion wird mittels optischer Filter kontrolliert, welche die Passage bestimmter Wellenlängen blockieren. Je

höher dann die Konzentration des gebundenen Antikörpers ist, desto stärker stellt sich das Fluoreszenzsignal dar. Die Wellenlänge der maximalen Absorption eines Farbstoffes informiert darüber, welcher Laser optimal für die Exzitation geeignet ist. Die Emissionsspektren der einzelnen Fluorophore unterscheiden sich in ihren Emissionsspektren. Dadurch lassen sich mehrere Fluoreszenzfarbstoffe in einer Messung verwenden. (Absatz [184])

Der verwendete Durchflusszytometer LSRFortessa besitzt vier Laser und kann bis zu 18 Parameter gleichzeitig messen. Jeder Parameter kann als Höhen-, Areal- oder Weitenwert in den Dot-Plots dargestellt werden. Die Laserpower beträgt wie folgt: UV 355 nm, violett 405 nm, blau 488 nm und rot 640 nm. Mithilfe von Kompensation, einer mathematischen Korrekturmethode, werden diejenigen Messwerte subtrahiert, die durch Überschneidung in den Emissionsspektren hervorgerufen werden (sogenanntes *Spillover*) [184].

2.4.3 Datenanalyse und *Gating*-Strategie

Die Analysesoftware FlowJo (siehe Tabelle 9) diente dazu, aus den – mittels des Durchflusszytometers LSRFortessa generierten – Rohdaten die Häufigkeit von Zellpopulationen und die Expression von Oberflächenmarkern zu bestimmen. Hierfür erfolgte zuerst ein *Gating* nach der CD4⁺-T-Zellpopulation. Das *Gating* wurde für alle T-Zellen eines *Panel*s übernommen. Die Häufigkeiten der CD4⁺-T-Zellpopulationen und der T-Zell-*Memory-Subsets* (steht stellvertretend für naive und Gedächtnis-T-Zelluntergruppen) wurden in Prozent angegeben. Die Einteilung der *Memory-Subsets* basiert auf der Markerexpression: Naive T-Zellen: CD197⁺ CD45RA⁺, T_{CM}: CD197⁺ CD45RA[–], T_{EM}: CD197[–] CD45RA[–] und TEMRA: CD197[–] CD45RA⁺. Die *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) der verschiedenen Panelmarker wurde je nach Fragestellung für die CD4⁺-T-Zellpopulation bzw. für die *Memory-Subsets* erfasst. Die MFI stellt die Fluoreszenzintensität von Zellen, die den gesuchten Marker exprimieren, gemittelt für alle gemessenen Zellen einer Probe, dar. Die Höhe der MFI einer Farbe deutet indirekt auf die Konzentration des untersuchten Markers hin. Die *Gating*-Strategie wurde in den folgenden Abbildungen (Abb. 2 und 3) dargestellt.

Gating-Strategie

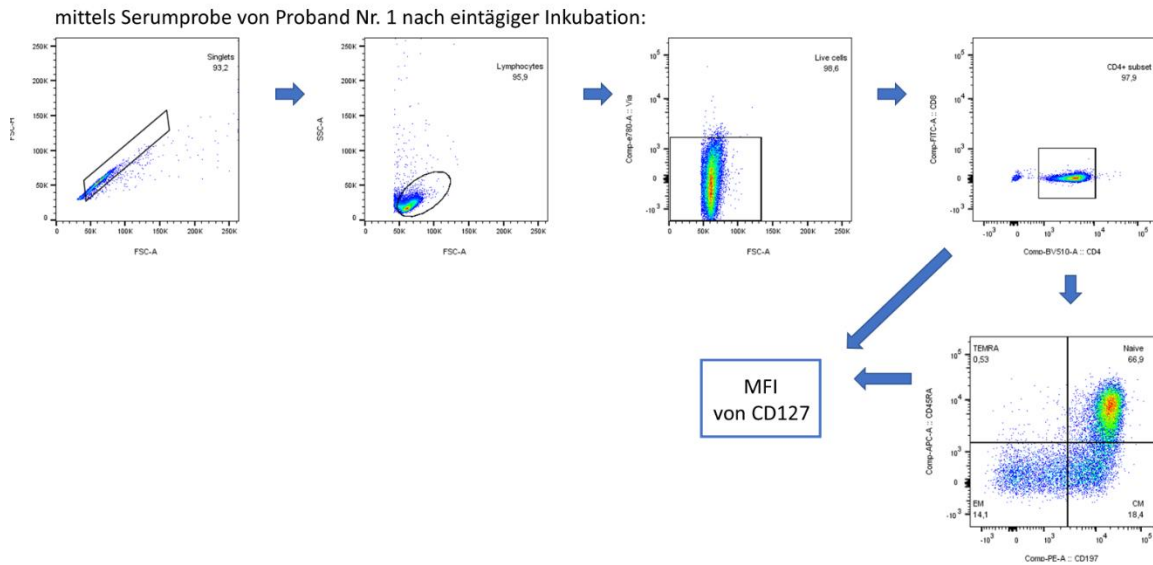


Abb. 3: Gating-Strategie der zu untersuchenden Zielpopulationen

Zu Beginn wurden die Zell-Duplets unter Verwendung des *Dot-Plots* –mit Auftragung von FSC-A gegen FSC-H– ausgeschlossen, sodass nur die *Singlets* analysiert werden. Anschließend wurden die Lymphozyten basierend auf Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) selektiert. Dann wurden diejenigen Zellen, welche den *Viability*-Farbstoff (Via-positiv) aufnehmen (z. B. tote Zellen, Zelltrümmer) entfernt. Schließlich wurde nach den CD4+-T-Zellen (*Cluster of Differentiation*) unter Ausschluss der CD8+ T-Zellen *gated*. Mittels Oberflächenmarker-Panel wurde dann der prozentuale Anteil (Häufigkeit) der jeweiligen naiven- und Gedächtniszellen an allen gezählten *Events* im *Gate* angegeben. Die Beispielzellen wurden mit der humanen Serumprobe von Proband Nr. 1 behandelt und wurden nach einem Tag gemessen. Abbildung aus der verwendeten FlowJo Software. FSC-A = forward scatter area, FSC-H = forward scatter height, SSC-A = sideward scatter area.

Gating-Strategie: pSTAT

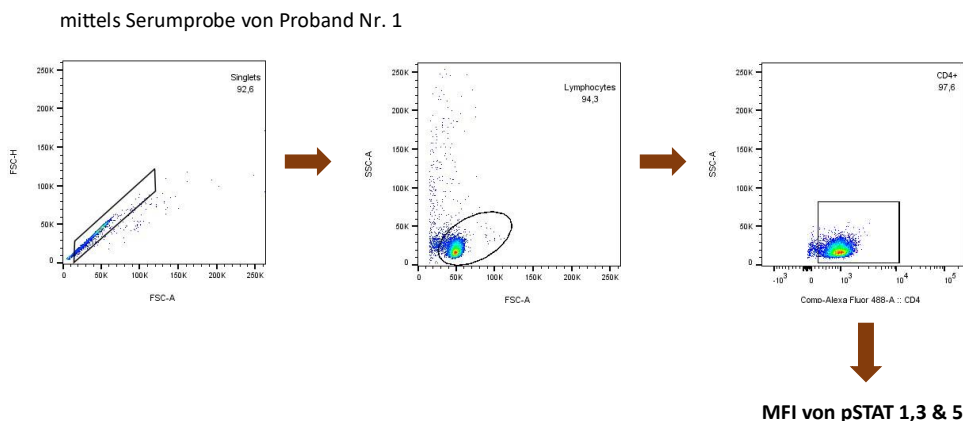


Abb. 4: Gating-Strategie der pSTAT-Moleküle

Die Zellen werden zunächst nach *Singlets*, dann nach Lymphozyten und schließlich nach CD4+-T-Zellen *gated* (s.o.). Von der Zielpopulation ausgehend bestimmt man die MFI der pSTAT-Moleküle 1,3 und 5. pSTAT = phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transcription.

2.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden über das Programm Excel sortiert und die Mittelwerte der Duplikate wurden berechnet. Dann wurden sie auf GraphPad Prism (siehe Tabelle 9) übertragen, um statistische Analysen durchzuführen. Es wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt, da der Median des jeweiligen Parameters der *gematchten* Patienten- und Kontrollgruppe miteinander verglichen wurde. In ausgewählten Fällen, bei welchen mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, kam der *Dunn's multiple comparison*-Test zur Anwendung. Ein p-Wert äquivalent zu oder weniger als 0,05 ($\leq 0,05$) wurde als signifikant betrachtet. Darüber hinaus wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Dabei wurden pSTAT-Moleküle mit Aktivierungsmarkern korreliert. Der Korrelationskoeffizient r sowie der p-Wert wurden angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls mithilfe der Software GraphPad Prism in Form von vergleichenden Säulendiagrammen (Mediandarstellung, Antennen (*Whiskers*) umfassen das 95-prozentige Konfidenzintervall) mit symbolischer Einzelwertdarstellung (*Buffy Coat* (BC) 1: Kreis, BC 2: Dreieck, BC 3: Quadrat). In den Korrelationen werden die Einzelwerte der Kontrollen als Kreise und diejenigen der T1D-Patienten als Quadrate abgebildet.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten der Patienten- und Kontrollgruppe

Die Studienkohorte kann anhand verschiedener Parameter beschrieben werden, welche bei der Rekrutierung erhoben wurden. Diese Parameter bzw. Gruppencharakteristika, wurden zu Übersichtszwecken in der folgenden Tabelle Nr. 10 aufgeführt. Die Gruppengrößen stehen in einem 1:1-Verhältnis und die Geschlechterverteilung ist zwischen beiden Gruppen ausgewogen. Zudem beginnt das Rekrutierungsalter im Kleinkindalter und endet in beiden Gruppen bei 17 Jahren. Der Mittelwert des Rekrutierungsalters variiert zwischen beiden Studiengruppen um ein Lebensjahr. Weiterhin liegt der Median der BMI-Perzentilen in der T1D-Gruppe etwas höher als in der Kontrollgruppe und weist eine geringere Spannbreite auf. Das mediane Alter bei Erkrankungsbeginn beträgt 7,3 Jahre und der mediane HbA1c-Wert beträgt 7,7 %. Definitionsgemäß beträgt die Erkrankungsdauer bei *Longterm*-Patienten mind. ein Jahr, sodass der Bereich der Erkrankungsdauer zwischen ein und 13 Jahren liegt.

Tabelle 10: Darstellung des Studienkollektivs

	T1D-Patienten	Kontrollen
Größe der Studienkohorte, n	30	30
Alter bei Rekrutierung, Jahre (Bereich)	12,5 (4-17)	11,5 (5-17)
Mittelwert:	12,1	11,1
Geschlecht (männlich/weiblich)	14/16	14/16
BMI-Perzentilen (Bereich)	78,5 (16-98)	69 (7-99)
Alter bei Erkrankungsbeginn (Bereich)	7,3 (1-12)	/
HbA1c in % (Bereich)	7,7 (6,3-10,3)	/
Erkrankungsdauer (Bereich)	3,7 (1-13)	/

Die Tabelle zeigt den Wert bzw. Median verschiedener Parameter für jeweils die T1D-Patienten- und Kontrollgruppe sowie das Minimum und Maximum in Klammern. Die Parameter umfassen die Größe der Studienkohorte, das Alter bei Rekrutierung in Jahren, das Geschlecht, die BMI-Perzentile, das Alter bei Erkrankungsbeginn, den HbA1c in % sowie die Erkrankungsdauer in Jahren. n = Anzahl. BMI = *Body Mass Index*. HbA1c = prozentualer Anteil des glykierten Hämoglobins.

3.2 Einfluss von T1D-Serumfaktoren auf die IL-7R α -Expression

3.2.1 Seruminduzierte IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen im Zeitverlauf

Die Expression des IL-7R ist stark reguliert und wird von Serumfaktoren beeinflusst. Unklar ist, ob ein verändertes Serumprofil beim T1D Auswirkungen auf das Expressionsniveau des IL-7R auf CD4+-T-Zellen hat. Die dahingehende Untersuchung erfolgte in mehreren, aufeinander aufbauenden Schritten.

In einem ersten Schritt untersuchten wir die seruminduzierte IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen im Zeitverlauf des Experiments. Der IL-7R α zeigte eine starke Regulation auf CD4+-T-Zellen in vitro in Präsenz von humanem Serum. Der IL-7R α wies eine signifikant höhere Expression am ersten Tag im Vergleich zum ex vivo Zeitpunkt ($p < 0,0001$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, s. Abb. 5) und auch am dritten Tag im Vergleich zum ersten Tag ($p < 0,0001$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, s. Abb. 5) auf. Folglich führt die Inkubation von CD4+-T-Zellen in humanem Serum nach einigen Stunden zu einer – mehr oder weniger stark ausgeprägten – Erhöhung der IL-7R α -Expression. Auch nach drei Tagen lässt sich teilweise ein Expressionsanstieg verzeichnen.

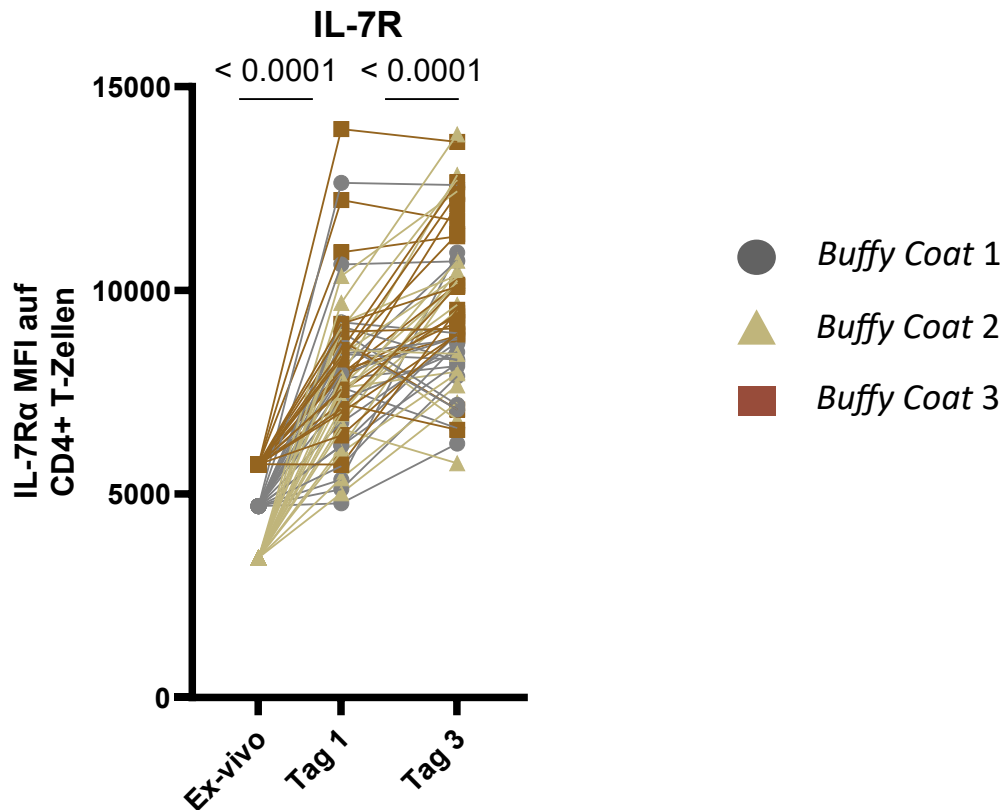


Abb. 5: Serum-induzierte IL-7Rα-Expression auf CD4+-T-Zellen im Zeitverlauf

Einfluss der Stimulation humaner CD4+-Referenz-T-Zellen mit humanem Serum von 30 gesunden Kontrollen und 30 T1D-Patienten auf die Expression vom IL-7Rα. Darstellung in *Connected-Symbol-Plots* und Einzelwertdarstellung in verschiedenfarbigen Symbolen (siehe Legende: grauer Kreis entspricht *Buffy Coat 1*; goldenes Dreieck steht für *Buffy Coat 2*; rostbraunes Viereck repräsentiert *Buffy Coat 3*). *Mean Flourescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Zeitverlauf auf der x-Achse. Angabe des p-Wertes erfolgt über einem horizontalen Strich (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

3.2.2 Kohortenvergleich der IL-7Rα-Expression auf CD4+-T-Zellen

Als nächsten Schritt führten wir zwischen der Patientenserum- und Kontrollserumgruppe einen Kohortenvergleich in Bezug auf die IL-7Rα-Expression auf CD4+-T-Zellen durch, um den Serumeinfluss beider Gruppen auf die IL-7Rα-Expressionslevels auf Referenz-T-Zellen miteinander zu vergleichen. Ein Trend zu einer verringerten IL-7Rα-Expression in Gegenwart von T1D-Serum im Vergleich zu gesunden Serumkontrollen wurde an Tag 1 ($p = 0,0767$; Wilcoxon-Test, s. Abb. 6) und Tag 3 beobachtet ($p = 0,2449$; Wilcoxon-Test, s. Abb. 6). Bei Betrachtung der absoluten Differenzwerte (Differenz der IL-7Rα-MFI auf CD4+-Referenz-T-

Zellen zwischen Tag 1 und ex vivo bzw. zwischen Tag 3 und ex vivo; positive Werte stehen für einen Expressionsanstieg und negative Werte für einen Expressionsabfall) erkennt man eine Tendenz in Richtung von reduzierten positiven Differenzwerten an Tag 1 in der T1D-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings gibt es keine signifikanten Unterschiede an beiden Messtagen ($p = 0,0767$ (Tag 1), $p = 0,2449$ (Tag 3); Wilcoxon-Test, s. Abb. 6). Es fand sich also eine Tendenz zu einer reduzierten in vitro Hochregulation des IL-7R α auf CD4+-Referenz-T-Zellen in der T1D-Serumgruppe.

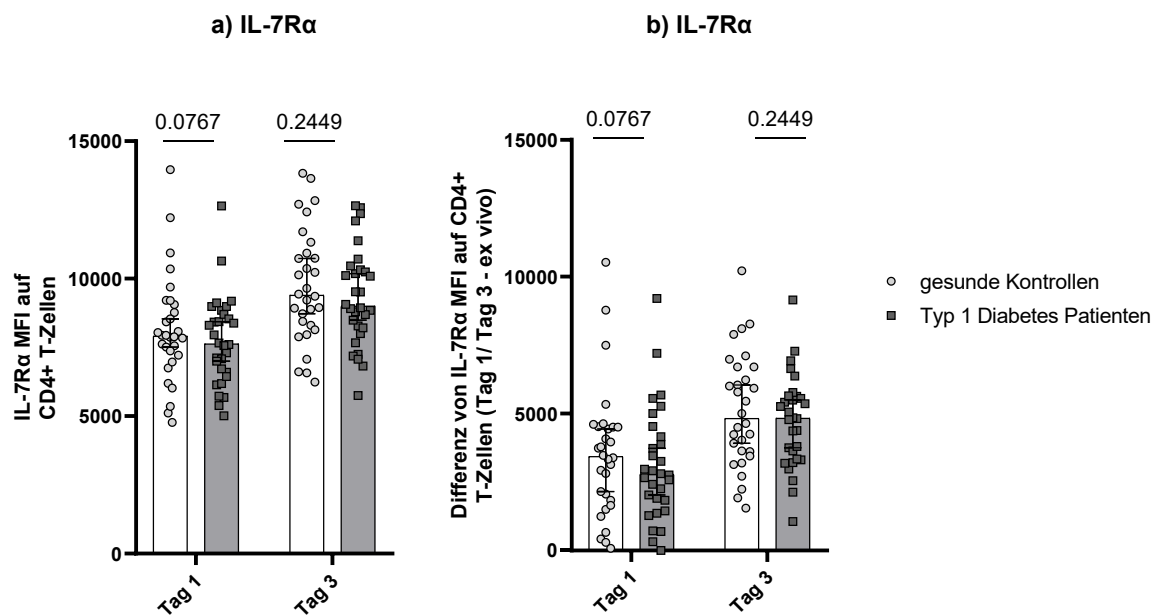


Abb. 6: Kohortenvergleich der IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen

Einfluss der Kultivierung humaner CD4+-Referenz-T-Zellen in humanem Serum von je gesunden Kontrollen und T1D-Patienten auf a) die Expression des IL-7R α und b) die absoluten Differenzwerte der IL-7R α -Expression. Separate Darstellung des Medians für Tag 1 und Tag 3 in Säulendiagrammen mit Einzelwertdarstellung in verschiedenfarbigen Symbolen (siehe Legende: hellgrauer Kreis für gesunde Kontroll-Serumprobe; dunkelgraues Quadrat für T1D-Serumprobe) und Whiskers, die das 95 %-Konfidenzintervall anzeigen. Mean Fluorescence Intensity (MFI) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Zeitpunkte auf der x-Achse. Angabe des p-Wertes erfolgt über einem horizontalen Strich (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

3.2.3 IL-7R α -Expression auf T-Zell-Memory-Subsets

In einem Folgeschritt differenzierten wir die CD4+-T-Zellpopulation in ihre *Memory-Subsets*, da bekannt ist, dass die einzelnen *Memory-Subsets* unterschiedliche IL-7R α -Expressionslevel aufweisen. Konsekutiv können die hier vermutlich unterschiedlichen

Expressionslevel der einzelnen *Subsets* einen Einfluss auf das IL-7R α -Expressionslevel der gesamten betrachteten CD4+-T-Zellpopulation haben. Hierbei erfolgte noch keine Aufteilung der Daten in eine Patienten- und Kontrollgruppe. Die Untergruppen scheinen sich in ihrer IL-7R α -Expression teilweise zu unterscheiden. Der Median der IL-7R α -Expression war sowohl für Tag 1 als auch für Tag 3 in der naiven Zellpopulation am niedrigsten, in den CM-Zellen etwas höher und in den EM-Zellen am höchsten (s. Abb. 7). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der naiven und der Temra-Untergruppe sowie an Tag 1 zwischen der CM- und Temra-Untergruppe. Folglich unterscheiden sich die einzelnen *Subsets* in ihrer jeweiligen IL-7R α -Expression, sodass ein Einfluss der CD4+-T-Zell-Komposition aus naiven/*Memory-Subsets* auf die IL-7R α -Expression von CD4+-T-Zellen vermutet wird.

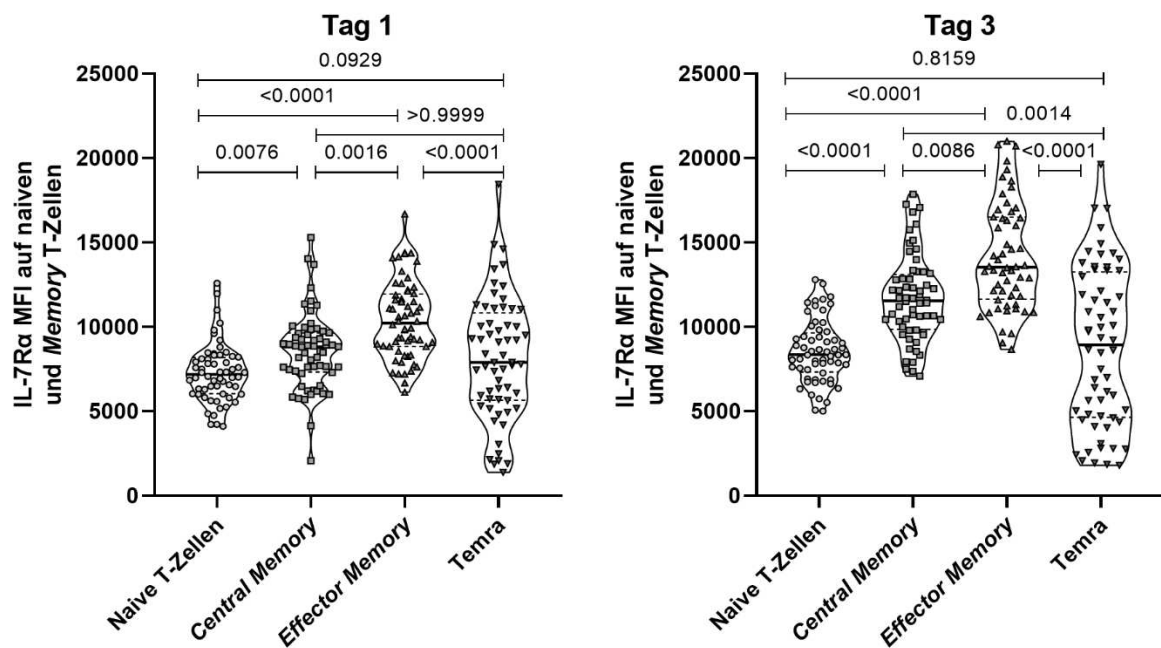


Abb. 7: Expression vom IL-7R α auf T-Zell-Memory-Subsets

Einfluss der Kultivierung von T-Zell-Memory-Subsets in humanem Serum von gesunden Kontrollen und T1D-Patienten auf die Expression vom IL-7R α . Darstellung für je Tag 1 und Tag 3 in Violin-Plots mit Einzelwertdarstellung in verschiedenfarbigen Symbolen sowie Abbildung des jeweiligen Medians als horizontale schwarze Linie. Mean Fluorescence Intensity (MFI) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Zellpopulationen auf der x-Achse. CM: Central Memory, EM: Effector Memory, Temra: Terminally differentiated effector memory. Der Dunn's multiple comparison-Test wurde zum gegenseitigen Vergleich der Gruppen verwendet. Angabe des p-Wertes erfolgt über einem horizontalen Strich.

3.2.4 Kohortenunterschiede in der Zusammensetzung der T-Zell-*Memory-Subsets*

Da wir vermuteten, dass die unterschiedlichen IL-7R α -Expressionslevels der CD4+-T-Zellen zwischen den beiden Kohorten von der Häufigkeitsverteilung der T-Zell-*Memory-Subsets* sowie ihren jeweiligen IL-7R Expressionslevels abhängig sind, verglichen wir die Kohorten auf die Zusammensetzung der T-Zell-*Memory-Subsets*. Die Häufigkeitsverteilung der T-Zell-*Memory-Subsets* unterschied sich nicht signifikant zwischen der gesunden Kontroll- und T1D-Serumgruppe an Tag 1 sowie für die CM-, EM- und Temra-Zellpopulation an Tag 3. Es bildeten sich lediglich nicht-signifikante Tendenzen in Richtung einer reduzierten Zellhäufigkeit aller *Subsets* in der T1D-Gruppe an Tag 1. An Tag 3 war die Häufigkeit der naiven Zellpopulation in der T1D-Gruppe signifikant niedriger ($p = 0,0227$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, s. Abb. 8), doch gerade diese Zellpopulation wies, wie oben beschrieben, das niedrigste IL-7R α -Expressionsniveau auf, sodass die geringere naive Zellhäufigkeit nicht mit der unterschiedlichen IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen zwischen den beiden Kohorten assoziiert zu sein scheint.

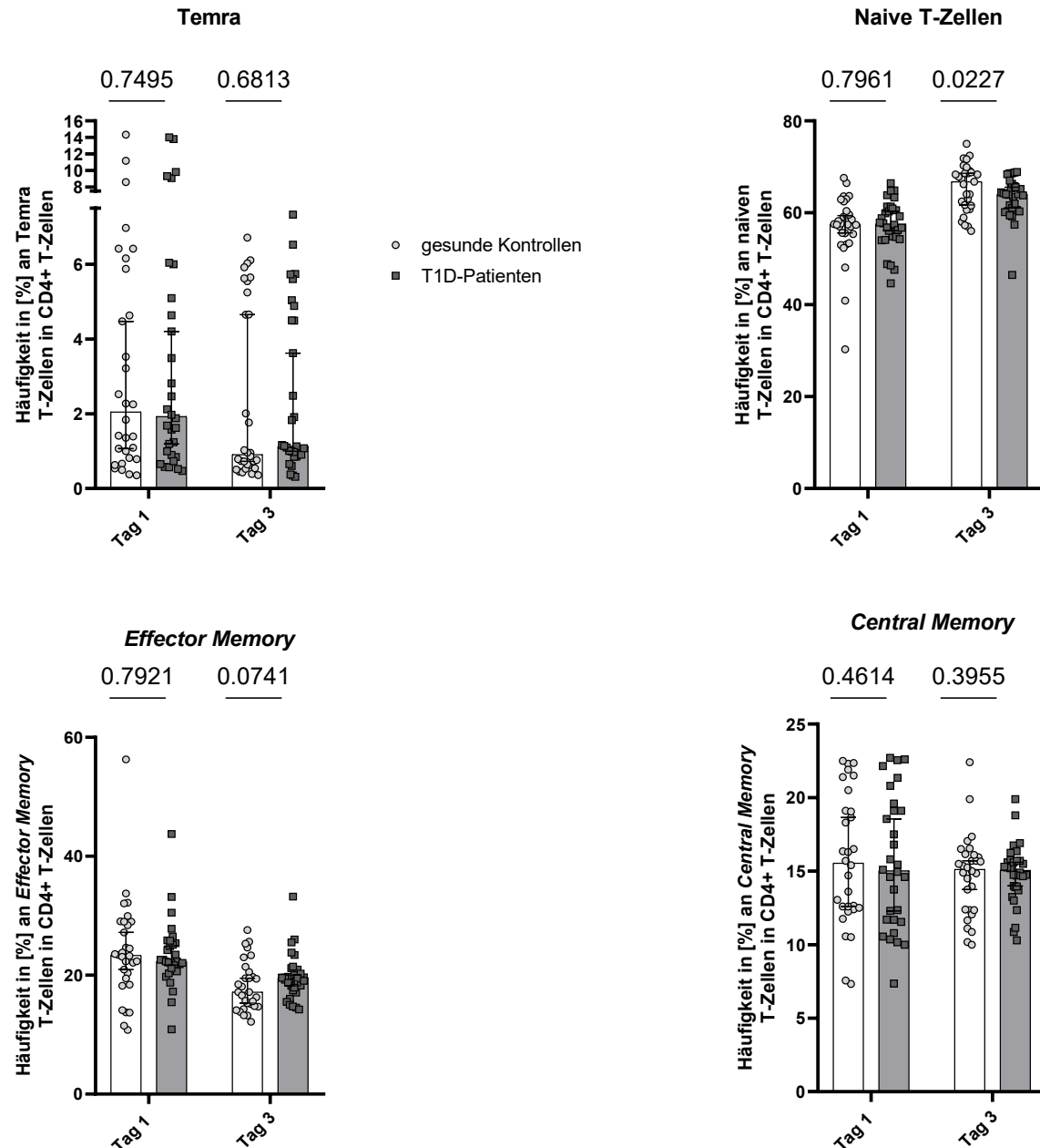


Abb. 8: Kohorten-Unterschiede in der Zusammensetzung der T-Zell-Memory-Subsets

Einfluss der Kultivierung humaner CD4+-Referenz-T-Zellen in vitro mit humanem Serum von je gesunden Kontrollen und T1D-Patienten auf die Häufigkeitsverteilung der naiven und Gedächtnis-T-Zellen. Darstellung des Medians für je Tag 1 und Tag 3 pro Gruppe in Säulendiagrammen mit Einzelwertdarstellung in unterschiedlich gefärbten Symbolen siehe Legende (weiße Balken: gesunde Kontrollproben, dunkelgraue Balken: T1D-Proben; grauer Kreis: *Buffy Coat* 1; goldenes Dreieck: *Buffy Coat* 2; rostbraunes Quadrat: *Buffy Coat* 3) und *Whiskers*, die das 95 %-Konfidenzintervall umfassen. Häufigkeiten (in %) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Zeitpunkte auf der x-Achse. Angabe des p-Wertes erfolgt über einem horizontalen Strich (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Naiv: Naive T-Zellen, CM: *Central Memory Cells*, EM: *Effector Memory Cells*, Temra: *Terminal T effector memory cells*.

3.2.5 IL-7R α -Expression auf T-Zell-*Memory-Subsets* im Kohortenvergleich

Nachdem wir grundsätzlich Unterschiede in den IL-7R α -Expressionslevels zwischen den *Memory-Subsets* feststellen konnten, unterteilten wir in einem Folgeschritt die Ergebnisse der IL-7R α -Expressionslevels erneut in eine Patienten- und Kontrollgruppe für jedes einzelne *Subset*, um Unterschiede zwischen beiden Probandengruppen herauszufiltern. Die IL-7R α -Expression auf den einzelnen T-Zell-*Memory-Subsets* unterschied sich partiell zwischen der gesunden Kontroll- und der T1D-Patienten-Serumgruppe. Die EM-*Subset* (an Tag 1: $p = 0,0035$, Tag 3: $p = 0,0426$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, s. Abb. 9) und die Temra-*Subset* (an Tag 3: $p = 0,0384$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, s. Abb. 9) wiesen jeweils eine signifikant reduzierte CD127-Expression in der T1D-Gruppe auf. Generell bestand die Tendenz einer reduzierten IL-7R α -Expression auf allen T-Zell-*Subsets* in der T1D-Serumgruppe sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3, mit Ausnahme der CM-Population an Tag 1, welche eine tendenziell erhöhte Expression in der T1D-Gruppe zeigte. Zusammenfassend führte die Inkubation von CD4+-T-Zellen in humanem Serum zu signifikant reduzierten IL-7R α -Expressionsleveln in den EM- und Temra-*Subsets* der T1D-Patientenserumgruppe, welche mit der insgesamt reduzierten IL-7R α -Expression in der CD4+-T-Zellpopulation der T1D-Kohorte assoziiert zu sein scheinen.

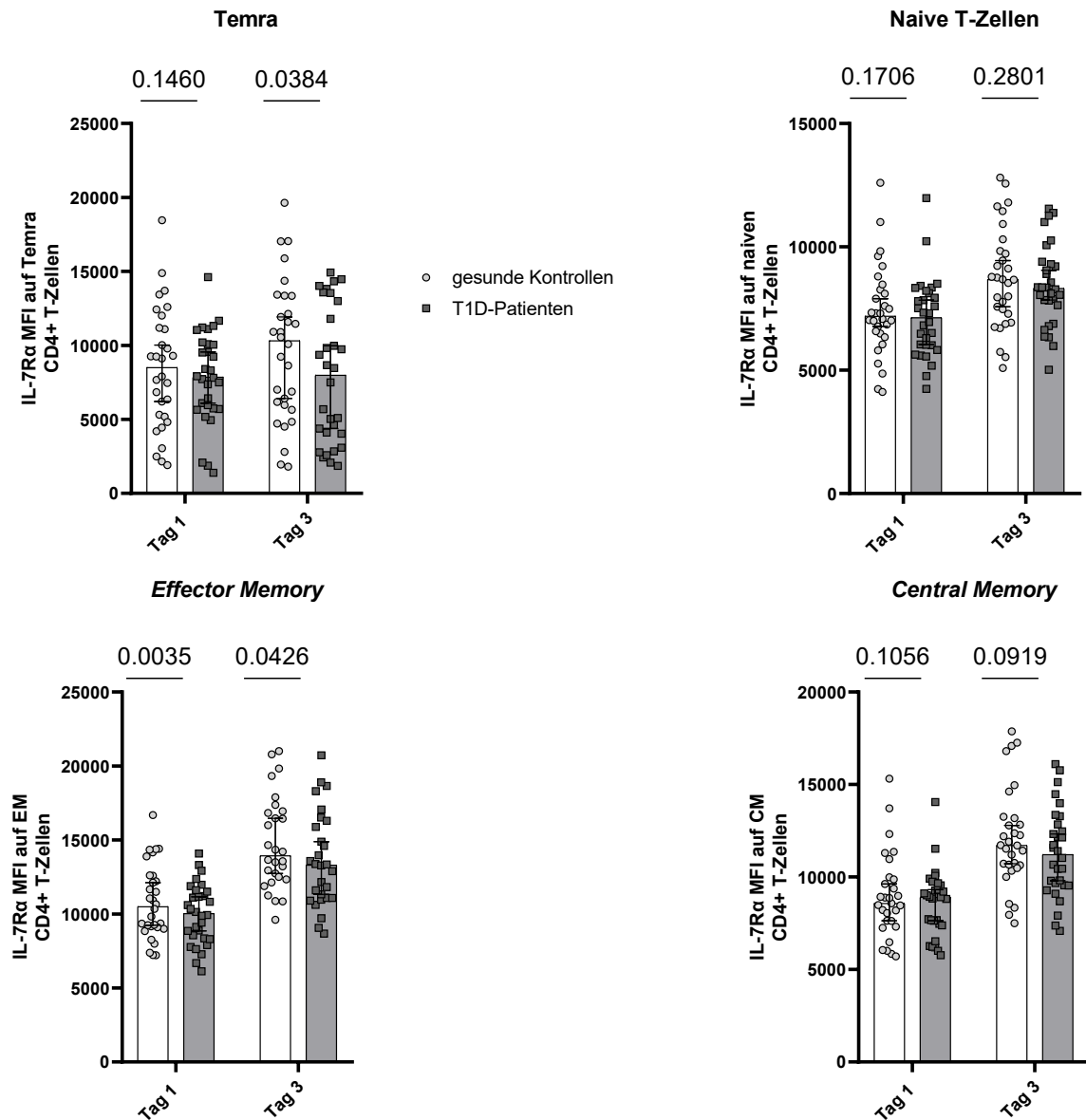


Abb. 9: IL-7Rα-Expression auf T-Zell-Memory-Subsets im Kohortenvergleich

Einfluss der Kultivierung humaner CD4+-Referenz-T-Zellen in vitro mit humanem Serum von je gesunden Kontrollen und T1D-Patienten auf die IL-7Rα-Expression der naiven und Gedächtnis-T-Zellen. Darstellung des Medians für je Tag 1 und Tag 3 pro Gruppe in Säulendiagrammen mit Einzelwertdarstellung in unterschiedlich gefärbten Symbolen (siehe Legende: hellgraue Kreise für gesunde Kontrollproben, dunkelgraue Quadrate für T1D-Proben) und *Whiskers*, die das 95 %-Konfidenzintervall umfassen. Mean Fluorescence Intensity (MFI) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Zeitpunkte auf der x-Achse. Angabe des p-Wertes erfolgt über einem horizontalen Strich (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Naiv: Naive T-Zellen, CM: *Central Memory Cells*, EM: *Effector Memory Cells*, Temra: *Terminal T effector memory cells*.

Um zu bestimmen, ob es sich um eine Hoch- bzw. Herabregulation des IL-7R α handelt und um den An- bzw. Abstieg der IL-7R α -Expressionslevel zu quantifizieren, verglichen wir die absoluten Differenzwerte der IL-7R α -Expression der T-Zell-*Memory-Subsets* miteinander. Der absolute Differenzwert der IL-7R α -Expression der einzelnen T-Zell-*Memory-Subsets* zwischen den Zeitpunkten ex vivo (ohne Seruminkubation) und Tag 1 bzw. Tag 3 unterschied sich teilweise zwischen der gesunden Kontroll- und der T1D-Patienten-Serumgruppe. Es zeigten sich T1D-seruminduzierte Veränderungen in den EM-, Temra- und CM-*Subsets*, welche jeweils eine signifikant reduzierte Differenz der IL-7R α -Expression aufwiesen (EM an Tag 1: $p = 0,0035$; Temra an Tag 3: $p = 0,0384$; CM an Tag 3: $p = 0,0491$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, s. Abb. 10). Die Differenzwerte der IL-7R α -Expressionslevel der jeweiligen *Subsets* befinden sich im positiven Zahlenbereich, was im Zeitverlauf als Hochregulation des IL-7R α in allen *Subsets* gewertet werden kann. Zusammenfassend sprechen die reduzierten Differenzwerte für eine reduzierte Hochregulation und nicht für eine Herabregulation des IL-7-Rezeptors in den entsprechenden *Subsets* der T1D-Gruppe, sodass das T1D-Patientenserum eher eine abgeschwächte Fähigkeit zur IL-7R α -Hochregulation aufweist.

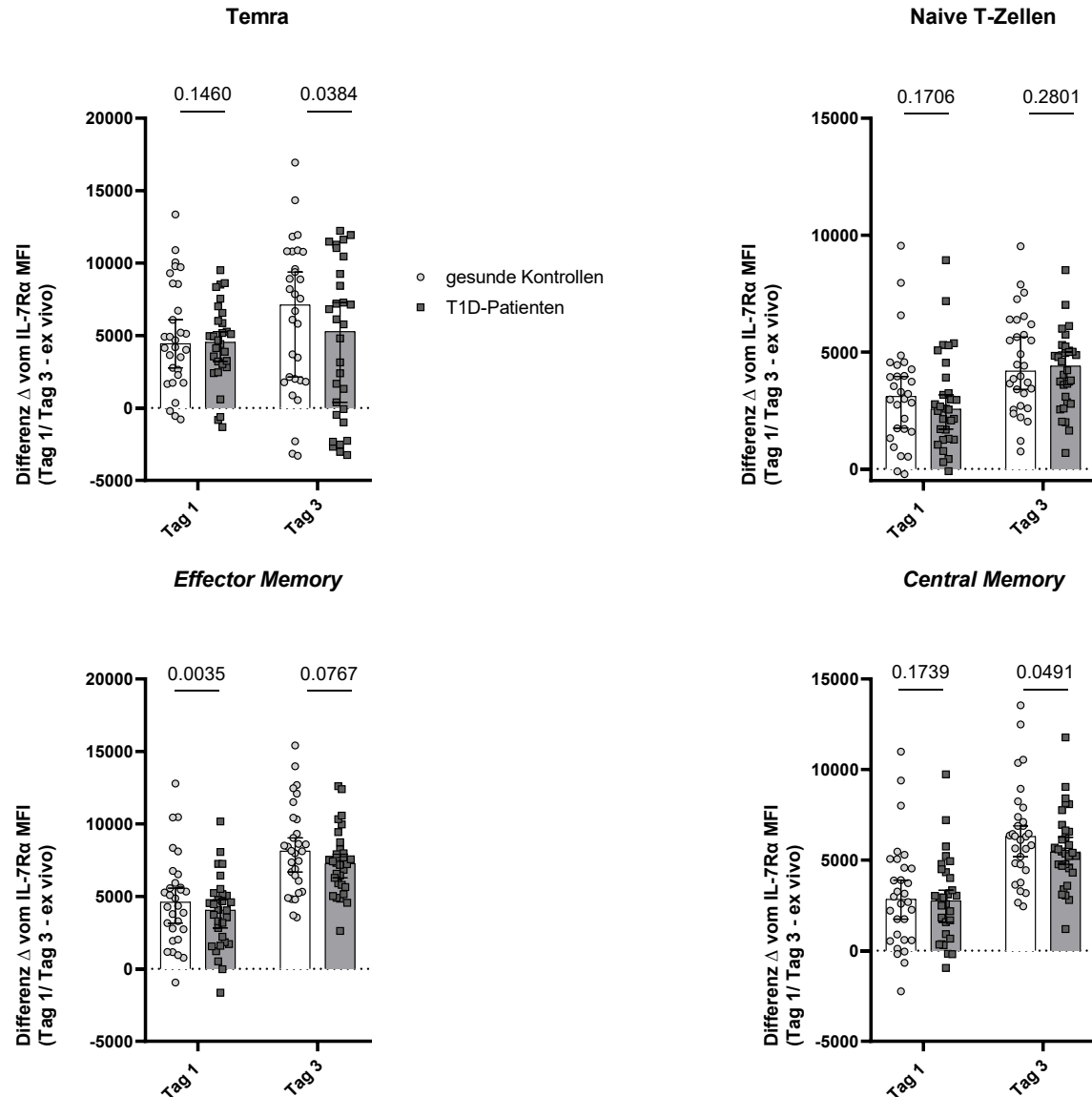


Abb. 10: Absolute Differenzen der IL-7R α -Expression der T-Zell-Memory-Subsets im Vergleich

Einfluss der Kultivierung humaner CD4+-Referenz-T-Zellen in vitro mit humanem Serum von je gesunden Kontrollen und T1D-Patienten auf die absoluten Differenzwerte der IL-7R α -Expression der T-Zell-Memory-Subsets zwischen den Zeitpunkten ex vivo und Tag 1 bzw. ex vivo und Tag 3. Darstellung des Medians für je Tag 1 und Tag 3 pro Gruppe in Säulendiagrammen mit Einzelwertdarstellung in unterschiedlich gefärbten Symbolen siehe Legende (weiße Balken: gesunde Kontrollproben, dunkelgraue Balken: T1D-Proben und Whiskers, die das 95 %-Konfidenzintervall umfassen. Absolute Differenz der *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Zeitpunkte auf der x-Achse. Angabe des p-Wertes erfolgt über einem horizontalen Strich (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Ex vivo: ohne Seruminkubation. Naiv: Naive T-Zellen, CM: Central Memory Cells, EM: Effector Memory Cells, Temra: Terminal T effector memory cells.

3.3 Einfluss von T1D-Serumfaktoren auf die STAT-Phosphorylierung in CD4+-T-Zellen

3.3.1 STAT-vermittelte Signaltransduktion

Parallel untersuchten wir die funktionelle Bedeutung der phänotypischen Veränderungen auf CD4+-T-Zellen mittels einer Analyse der Phosphorylierung von intrazellulären STAT-Proteinen in der CD4+-Referenz-T-Zellpopulation. Es sollte analysiert werden, ob Veränderungen in der Expression von Zytokin-Rezeptoren einen Einfluss auf die STAT-Phosphorylierung haben. Daher wurde erst nach Unterschieden in der Phosphorylierung der STAT-Proteine zwischen der Kontroll- und der T1D-Patientenserumgruppe gesucht.

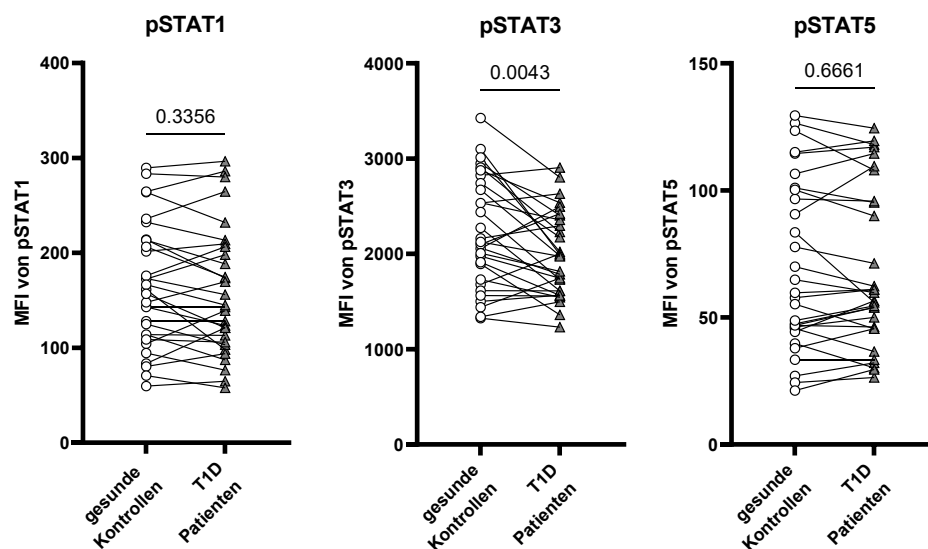


Abb. 11: Expressionslevel von phosphorylierten STAT-Proteinen im Vergleich

Einfluss der Kultivierung humaner CD4+-Referenz-T-Zellen in vitro mit humanem Serum von je gesunden Kontrollen und T1D-Patienten auf die Phosphorylierung von STAT-Proteinen an Tag 1. Darstellung in *Connected-Symbol-Plots* mit Einzelwertdarstellung in unterschiedlich gefärbten Symbolen (weiße Kreise: gesunde Kontrollserumproben, dunkelgraue Dreiecke: T1D-Serumproben). *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Probandengruppe auf der x-Achse. Angabe des p-Wertes erfolgt über einem horizontalen Strich (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). pSTAT: *phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transcription*.

Hierfür verglichen wir in vitro die Expressionslevels der intrazellulären phosphorylierten STAT-Proteine 1, 3 und 5 zwischen der Kontroll- und der T1D-Patientenserumgruppe, da diesen spezifischen Proteinen eine wichtige Rolle im JAK-STAT-Signalweg von IL-7 zugeschrieben wurde [[32], [185], [113]]. Die pSTAT3-Expressionslevel zeigten eine

signifikante Reduktion in der T1D-Serumgruppe ($p = 0,0043$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, s. Abb. 11), wohingegen die Proteine pSTAT1 und pSTAT5 sich nicht zwischen den beiden Gruppen unterscheiden.

3.3.2 Korrelation von pSTAT3 mit IL-7R α

Da pSTAT3 eine signifikante Reduktion des Expressionsniveaus zeigte, wurde dieses Protein anschließend mit den veränderten Zytokinrezeptor-Expressionslevels korreliert. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen den Expressionslevels von pSTAT3 und IL-7R α an Tag 1 bzw. Tag 3 sowohl bei der gemeinsamen (Tag 1: $p = 0,366$, $r = 0,1188$; Tag 3: $p = 0,74$, $r = -0,04$; s. Abb. 12) als auch bei der – in Kontroll- und T1D-Patientenserumgruppe – separierten statistischen Analyse (Tag 1 gesunde Kontrollen: $p = 0,185$, $r = 0,2485$; T1D-Patienten: $p = 0,95$, $r = -0,01$; Tag 3 gesunde Kontrollen: $p = 0,88$, $r = 0,026$; T1D-Patienten: $p = 0,47$, $r = -0,135$; s. Abb. 12). Daher ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem pSTAT3-vermittelten Signalweg und der reduzierten IL-7R α -Expression auf CD4 $^{+}$ -T-Zellen in der T1D-Kohorte nachweisen.

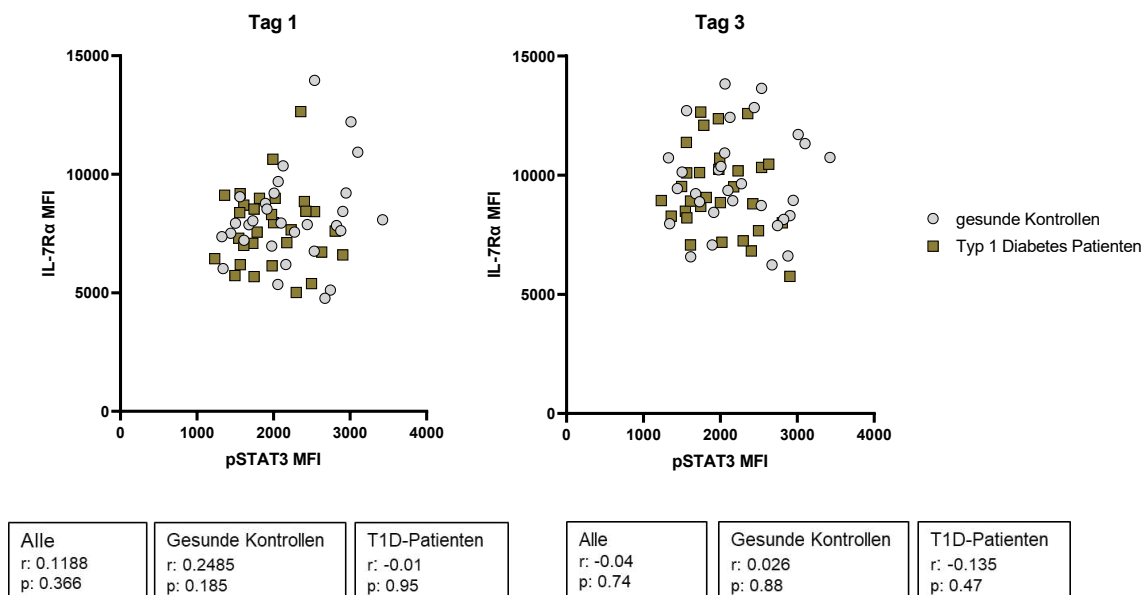


Abb. 12: Korrelation von pSTAT3 mit der IL-7R α -Expression im Vergleich

Korrelation der Expressionslevels von pSTAT3 mit der IL-7R α -Expression an Tag 1 bzw. Tag 3 nach Koinkubation mit humanem Serum. Einzelwertdarstellung in unterschiedlich gefärbten Symbolen siehe Legende (hellgraue Kreise: gesunde Kontrollserumproben, braune Quadrate: T1D-Serumproben). *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) vom IL-7R α auf der y-Achse (lineare Skalierung), MFI von pSTAT3 auf der x-Achse (lineare Skalierung). Darstellung der Rangkorrelationskoeffizienten R nach Spearman und der p-Werte in Boxen für jeweils die

gemeinsame und getrennte statistische Analyse beider Probandengruppen. pSTAT: *phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transcription*.

Schließlich korrelierten wir pSTAT3 mit den absoluten Differenzwerten der IL-7R α -Expressionslevels. Es stellte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen den absoluten Differenzwerten der Expressionslevels des IL-7R α und den Expressionslevels von pSTAT3 an Tag 1 bzw. Tag 3 sowohl bei der gemeinsamen (Tag 1: $p = 0,413$, $r = 0,108$; Tag 3: $p = 0,845$, $r = -0,026$; s. Abb. 13) als auch der – in Kontroll- und T1D-Patientenserumgruppe – separierten statistischen Analyse (s. Abb. 13) dar. Folglich scheint die reduzierte pSTAT3-Expression nicht mit den reduzierten positiven Differenzwerten des IL-7-Rezeptors der CD4+-Referenz-T-Zellpopulation in der T1D-Serumgruppe assoziiert zu sein. Es muss daher noch identifiziert werden, welche Faktoren für die niedrigere pSTAT3-Expression in der T1D-Serumgruppe verantwortlich sind.

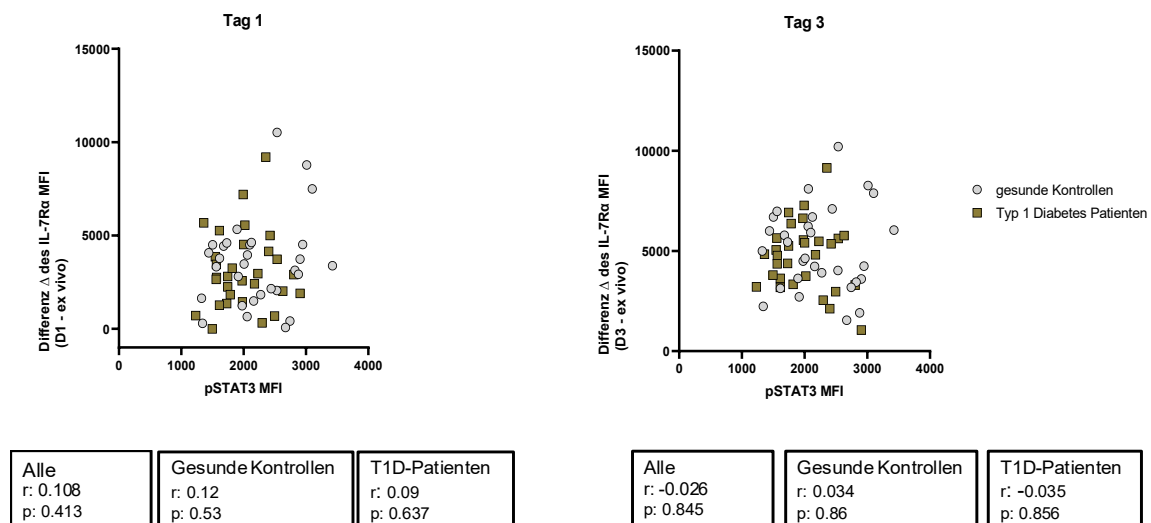


Abb. 13: Korrelation von pSTAT3 mit der Differenz der IL-7R α -Expression im Vergleich

Korrelation der Expressionslevels von pSTAT3 mit den absoluten Differenzwerten (Δ) der IL-7R α -Expression an Tag 1 bzw. Tag 3 nach Koinkubation mit humanem Serum. Einzelwertdarstellung in unterschiedlich gefärbten Symbolen siehe Legende (hellgraue Kreise: gesunde Kontrollserumproben, braune Quadrate: T1D-Serumproben). Absolute Differenz der *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) von IL-7R α auf der y-Achse (lineare Skalierung), MFI von pSTAT3 auf der x-Achse (lineare Skalierung). Darstellung der Rangkorrelationskoeffizienten R nach Spearman und der p-Werte in Boxen für jeweils die gemeinsame und getrennte statistische Analyse beider Probandengruppen. Ex vivo: ohne Seruminkubation. pSTAT: *phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transcription*.

4 Diskussion

4.1 Anwendungen des Serum-Assays: Untersuchung des Einflusses einer krankheitsspezifischen Serumsignatur auf den Immunzell-Phänotyp

Der in dieser Studie verwendete in vitro Serum-Assay fand bereits Anwendung in einigen weiteren Studien und wurde entsprechend an das jeweilige Studiendesign modifiziert. Diese Studien haben mithilfe des Serum-Assays versucht, den Einfluss einer krankheitsspezifischen Serumsignatur auf den Immunzell-Phänotyp zu bestimmen. Inkubationsdauer, Kulturmedium, Serumursprung, Serumanteil und die Art der isolierten Zellen können variieren. Die hiesige Verwendung eines zehnprozentigen Serumanteils ist angelehnt an die ursprüngliche experimentelle Durchführung des Serum-Assays von Kleinhenz et al. [182], welche zehnprozentiges hitzeinaktiviertes *gepooltes* menschliches Serum und Tuberkulose-Plasma (TB-Plasma) verwendet haben, um die supprimierende Wirkung des TB-Plasmas auf die Lymphozytenantwort zu untersuchen. Auf diesem Fundament basieren einige Veröffentlichungen meiner Arbeitsgruppe, welche den Einfluss von TB-Plasma/-Serum auf T-Zellen bzw. Monozyten untersucht haben und unter anderem herausfanden, dass Serumproben von TB-Patienten die IL-7R α -Expression in humanen Monozyten verstärken und dass das Plasma-Milieu potenzielle Auswirkungen auf den Monozyten-Phänotyp und die -Funktion in akuter Tuberkulose haben kann [186]. Schließlich gelangen wir damit zur aktuellen Fragestellung, bei welcher der Einfluss von humanem T1D-Serum auf den T-Zellphänotyp untersucht werden soll.

4.2 Einfluss des Serums auf naive und *Memory-Subsets*

Zahlreiche Studien fokussieren sich auf Veränderungen in den naiven und Gedächtnis-T-Zellpopulationen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Die naiven T-Zellen verringern sich nach Antigen-Stimulation durch Differenzierungen. Es ist daher wahrscheinlich, dass die naive Zellzahl unter Immunstress wie dem Auftreten einer Autoimmunerkrankung reduziert wird. Andererseits sollten Gedächtniszellen in diesem Kontext zunehmen. Die Serumpräsenz im Versuch führte zu nicht-signifikanten Tendenzen in Richtung einer reduzierten Zellhäufigkeit aller Gedächtniszell-Untergruppen in der T1D-

Gruppe an Tag 1. Die Häufigkeit der naiven Zellpopulation in der T1D-Gruppe war an Tag 3 signifikant niedriger. Unsere Ergebnisse bestätigen die Hypothesen also nur zum Teil. Vorarbeiten haben beschrieben, dass naive T-Zell-Häufigkeiten einen Trend in Richtung Reduktion in T1D-Patienten zeigten [47, 187]. Zudem wurde der relative Anteil an zentralen T-Gedächtniszellen an allen T-Gedächtniszellen in *New-Onset*-T1D-Patienten im Gegensatz zu Gesunden als signifikant niedriger beschrieben [24]. Matteucci et al. beschrieben ebenfalls, dass die zentralen T-Gedächtniszellen in T1D-Patienten reduziert sind [47]. Andererseits werden auch erhöhte (Effektor- [35]) T-Gedächtniszellen in der T1D-Gruppe beschrieben [31, 187], was die Bedeutung der Antigen-erfahrenen T-Gedächtniszellen hervorhebt. Die konstante Präsenz des Selbstantigens in Autoimmunerkrankungen wie T1D könnte die Transition von T_{CM} zu T_{EM} triggern, sodass sich die T_{EM} zur dominanten Untergruppe der T-Gedächtniszellen entwickeln könnten [188] und eine erhöhte TEMRA-Zellzahl infolge einer Akkumulation erklären [47].

4.3 Einfluss des Serums auf die IL-7R-Expression

Vorarbeiten meiner Arbeitsgemeinschaft [151] haben erhöhte IL-7R α -Expressionslevels (CD127) in CD4+-T-Zellen in T1D-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben. Um herauszufinden, ob dieser Unterschied in der *in vivo* Expression seruminduziert ist, wurde anhand des bereits beschriebenen *in vitro* Serum-Assays die IL-7R α -Expression auf Referenz-T-Zellen nach ein- bzw. dreitägiger Koinkubation in T1D-Patienten- und Kontroll-Serum analysiert.

IL-7R-Expression im Zeitverlauf

Zunächst wurde das seruminduzierte IL-7R α -Expressionsniveau im Zeitverlauf dargestellt. Dieser zeigte eine stark unterschiedliche Regulation auf CD4+-Referenz-T-Zellen *in vitro* in Präsenz von – aus T1D-Patienten und gesunden Kontrollen stammenden – Seren. Der IL-7R α wurde nach eintägiger Inkubation in den verschiedenen humanen Seren größtenteils hochreguliert, das Ausmaß der Hochregulation unterschied sich jedoch zwischen den individuellen Seren. Das Serumprofil der verschiedenen Spender ist individuell einzigartig und kann somit zu Unterschieden in der IL-7R α -Expression führen. Der IL-7R α wird nach

regulärer T-Zell-Aktivierung herabreguliert und im Anschluss daran von bestimmten differenzierten T-Zellen reexprimiert [32]. Es ist zu diskutieren, welche Serumfaktoren spezifisch dafür verantwortlich sind, die von uns beobachtete Beeinflussung der IL-7R α -Regulation von CD4+-T-Zellen hervorzurufen. Bekannt ist, dass die im Serum befindlichen Zytokine wie z. B. Typ-1-Interleukine und TNF- α proinflammatorische Eigenschaften aufweisen. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte diesbezüglich zeigen, dass Serumproben von an Tuberkulose erkrankten Patienten in der Lage waren, die IL-7R α -Expression auf Monozyten hochzuregulieren [189]. Zudem konnten sie spezifische Serumzytokine, wie z. B. IL-1 β und TNF- α , identifizieren, welche die Expression von IL-7R α auf Monozyten induzieren [189].

IL-7R-Expression auf CD4+-T-Zellen im Vergleich

Der von uns beobachtete Trend in Richtung einer reduzierten IL-7R α -Expression in der Präsenz von T1D-Serum im Vergleich zum Serum gesunder Kontrollen deutet nicht darauf hin, dass T1D-Serumfaktoren für die von Seyfarth et al. beschriebene – verglichen mit gesunden Kontrollen – erhöhte IL-7R α -Expression auf CD4+-T-Zellen in T1D-Patienten verantwortlich sind [151]. Das T1D-Serum schien eher eine reduzierte Fähigkeit zu haben, den IL-7R α hochzuregulieren. Möglicherweise spielen hier gegenregulatorische Effekte des Serums eine Rolle, die es noch zu identifizieren gilt.

Kontroverserweise zeigten die Untersuchungen von Moniuszko et al. gegensätzliche Ergebnisse. Hier sind die IL-7R-Expressionslevel in Langzeit-T1D-Patienten nämlich reduziert gewesen [86]. Dies kann zumindest teilweise durch die Anhäufung von T_{regs} erklärt werden, welche niedrige bis negative IL-7R-Expressionslevel aufweisen [94, 190]. Langzeit-T1D-Patienten sind nämlich mit einem Anstieg von T-Zellen, welche einen regulatorischen Phänotyp (CD25+CD127-) aufweisen, assoziiert [86]. Bei der Infektionskrankheit HIV sind anscheinend reduzierte IL-7R α -Level mit dem Krankheitsprogress und gesteigertem CD4+-T-Zell-Tod assoziiert [191]. In anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis exprimierten Monozyten gesteigerte IL-7R-Level im Gegensatz zu Gesunden [192]. Ein vorgeschlagener Erklärungsansatz für die Hochregulation von ungebundenem IL-7 ist die potenzielle Expansion von CD8+ T-Zellen mit einer niedrigen IL-7R-Expression in

Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, was zur Stimulation von anderen Autoimmunerkrankungen und pro-inflammatorischen Mechanismen führen kann [193].

IL-7R-Expression auf T-Zell-Memory-Subsets

Bekanntermaßen exprimieren alle naiven- sowie die Mehrheit der CD4+-Gedächtnis-T-Zellen den IL-7R α . Ein niedriges Expressionslevel zeigt sich in T_{regs} [95] sowie in zwei spezifischen Subpopulationen der T-Gedächtniszellen [194, 195]. T-Gedächtniszellen hingegen exprimieren hohe IL-7R-Expressionslevel, welche in Voruntersuchungen als ähnlich [96] oder niedriger im Vergleich zu naiven T-Zellen beschrieben wurden [196]. Gegensätzlich dazu war die IL-7R α -Expression in unserem Serum-Assay in der naiven Zellpopulation am niedrigsten und in der EM-Zellpopulation am höchsten. Serumfaktoren wie proinflammatorische Zytokine könnten hierbei eine wichtige Rolle spielen, indem sie das IL-7-*Signalling* beeinflussen, welches einen wichtigen Beitrag zur IL-7R-Regulation leistet. Nguyen et al. beschrieben beispielsweise, dass TGF- β keinen Einfluss auf das IL-7R-*Signalling* in T-Gedächtniszellen hat, wohingegen das *Signalling* in naiven T-Zellen selektiv gesteigert wurde [180]. Das Serumprofil kann also einen Einfluss auf die unterschiedliche IL-7R-Expression der naiven und Gedächtnis-T-Zellen haben.

Das Serum der T1D-Probandengruppe induzierte nach ein bzw. drei Tagen eine reduzierte Expression des IL-7R α auf EM- und Temra-T-Zellen. Dies weist darauf hin, dass im T1D-Serum potenziell Faktoren vorhanden sind, welche die IL-7R α -Expression bzw. -Hochregulation beeinträchtigen können. Es könnte sich auch um einen Mangel an, für die Expression benötigten, Serumfaktoren oder um gesteigerte, die Hochregulation hemmende, Faktoren handeln. Es wurden einige Faktoren beschrieben, welche die Expression des IL-7R regulieren bzw. beeinflussen können. Darunter gehört z. B. T-bet, bei welchem es sich um einen transkriptionellen Repressor der IL-7R-Expression handelt [197]. Im Kontrast dazu erhöhen die PU.1- und GA-Bindeprotein (GABP)-Transkriptionsfaktoren die IL-7R α -Expression [77]. Einer der wichtigsten Faktoren jedoch ist das namensgebende Zytokin IL-7, welches direkt an den Rezeptor bindet. Hohe Konzentrationen an IL-7 in vitro führen zu einer raschen Senkung der IL-7R-Oberflächenexpression [198]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in murinen T-Zell-Tiermodellen beobachtet [87]. Park et al. zeigten, dass die Entfernung von murinen T-Zellen aus ihrer zytokinreichen in vivo Umgebung zu einem deutlichen Anstieg der IL-7R α -Oberflächenexpression sowie der

mRNA-Level führte [87]. Die externe Gabe von IL-7 führte anschließend zu einer starken Reduktion von IL-7R α sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene. Es scheint, dass es sich um einen spezifischen Effekt auf die IL-7R α -mRNA handelt, da die γ c-mRNA-Level unverändert blieben [87]. Ursächlich hierfür ist bei CD8+ T-Zellen, jedoch nicht bei CD4+-T-Zellen, wahrscheinlich die IL-7-induzierte Hochregulation des Transkriptionsrepressors *Growth-factor independent 1* (GFI1), welcher das – unter physiologischen Bedingungen – limitierte IL-7 indirekt reguliert [199]. Die beobachteten in vitro IL-7-Effekte sind auf die in vivo Situation übertragbar, denn mithilfe von IL-7-neutralisierenden monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass endogenes murines IL-7 die IL-7R-Expression auf in vivo T-Zellen unterdrückt [87]. Folglich könnten erhöhte IL-7-Expressionslevel im T1D-Serum (wie sie bei Langzeit-T1D-Patienten beschrieben worden sind [141]) und eine IL-7-induzierte Transkriptionshemmung ein Erklärungsansatz dafür sein, dass in der T1D-Serumgruppe in vitro eine eingeschränkte IL-7R-Hochregulation beobachtet wurde. In vivo hingegen spielt der Verbrauch des limitierten IL-7 durch die miteinander konkurrierenden Populationen des T-Zell-Spektrums bei der Interpretation von Beobachtungen eine besondere Rolle. Dieser Aspekt ist nicht unerheblich, um die in vivo erhöhten IL-7R-Expressionslevel auf CD4+-T-Zellen in T1D-Patienten [151] zu deuten.

Darüber hinaus sind die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6 und IL-15, die das Überleben fördern, ebenfalls von Bedeutung. Sie reduzieren den Gehalt an IL-7R α -mRNA in primären T-Zellen durch Transkriptionshemmung [87]. Hierdurch scheint die Größe des peripheren T-Zell-Pools während der andauernden Konkurrenz zwischen naiven T-Zellen um limitiertes IL-7 maximiert zu werden [87]. Das Zytokin TNF- α scheint den IL-7R in T-Zellen hingegen hochzuregulieren [87]. Darüber hinaus kann die therapeutische Behandlung von T1D-Patienten in Form von monoklonalen Antikörpern [200] bzw. einer externen Zytokingabe ebenfalls Einfluss auf die Expression von Oberflächenmarkern bzw. den Phänotyp von T-Zellen nehmen [200, 201].

4.4 Einfluss des Serums auf die STAT-Phosphorylierung

Begleitend wurden T-Zell-Signalwege analysiert, um die zugrundeliegenden Mechanismen der Serumeffekte auf T-Zellen zu beleuchten. Hierzu wurde die STAT-vermittelte Zytokin-Signaltransduktion untersucht. Die pSTAT3-Expressionslevel zeigten eine signifikante Reduktion in der T1D-Serumgruppe. Ursächlich könnten Serumfaktoren in T1D-Patienten sein, welche eine Hochregulation negativ beeinflussen bzw. kompensieren, oder es könnte sich um einen Mangel an spezifischen Faktoren handeln, welche für die Aufrechterhaltung eines Standard-Expressionslevels, beispielsweise über permanente Stimulation, benötigt werden. Zudem zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen den Expressionslevels von pSTAT3 und dem IL-7R α , sowohl als absolute MFI-Werte als auch als Differenzwerte. Die Expression der allgemeinen Gamma-Kette – welche gemeinsam mit dem IL-7R α den IL-7R-Heterodimer bildet – könnte hierbei eine Rolle spielen. Daher ist noch unklar, welche Faktoren für die reduzierte pSTAT3-Expression in der T1D-Gruppe verantwortlich sind. Die unterschiedlichen Zytokinexpressionslevel in den Seren von T1D-Patienten sowie gesunden Kontrollen könnten eine erhebliche Rolle in der Regulation von Transkriptionsfaktoren spielen. Bekannt ist, dass IL-2, IL-6, IL-10 und IL-21 sowie TGF- β zu den wichtigsten Zytokinen gehören, welche die JAK-STAT-3-Kaskade aktivieren [69].

Assoziationen zwischen den STAT-Proteinen sowie dem T1D wurden mehrfach beschrieben. Pirot et al. haben unter anderem zusammengefasst, dass im Serum befindliche Zytokine wie INF- γ den Transkriptionsfaktor STAT-1 aktivieren [202], was zur funktionellen Beeinträchtigung und folglich zur Apoptose von Beta-Zellen führen kann [203]. Dementsprechend wurde beobachtet, dass die Blockade von STAT-1, dem Hauptsignalweg von INF- γ , auf Beta-Zell-Ebene vor Streptozotocin-induziertem Diabetes schützen kann [204]. STAT1 – und unter bestimmten Bedingungen auch STAT3 – übermitteln anscheinend pro-apoptotische Signale, wohingegen STAT3 sowie STAT5 mit der Förderung des Zell-Überlebens assoziiert werden [202]. Weiterhin gibt es monogenetische Immundysregulationssyndrome, bei welchen der T1D eine der Autoimmunmanifestationen darstellt. *Gain-of-function*-Mutationen in STAT1 und STAT3 sowie ein STAT5b-Defekt werden beispielsweise mit einer erhöhten Empfänglichkeit für den T1D assoziiert [69].

4.5 Limitationen der Methode

Die Beachtung der Limitationen ist für jede wissenschaftliche Studie bedeutend, um die Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang des aktuellen Forschungsstandes zu ermöglichen. Im Hinblick auf die verwendeten Methoden gab es erwähnenswerte Limitationen. Hierzu zählt die eingeschränkte Kulturdauer, da die T-Zellen in den genannten Kulturbedingungen nur für eine beschränkte Zeit überleben können. Aus Gründen der Praktikabilität und der für den Versuch benötigten Zellzahl wurde nicht ein *Buffy Coat*, sondern insgesamt drei *Buffy Coats* herangezogen. Die analysierten Referenz-T-Zellen wurden also aus *Buffy Coats* von drei individuellen, gesunden Spendern isoliert. Es wurden demnach drei sequenziell voneinander getrennte Experimente durchgeführt, die hinsichtlich des Ablaufs miteinander vergleichbar sind. Potenziell können Unterschiede zwischen den Referenz-T-Zellen unterschiedlicher Spender vorhanden sein. Wir konnten jedoch relevante Unterschiede in der seruminduzierten IL-7R α -Expression der Referenz-T-Zellen zwischen den drei *Buffy Coats* ausschließen (siehe Anhang 1). Es zeigte sich lediglich ein signifikanter Wert in der Kontrollgruppe am dritten Untersuchungstag. Ursächlich für die unterschiedliche IL-7R α -Expression auf den Referenz-T-Zellen der beiden verschiedenen *Buffy-Coat*-Spendern könnten inter-individuelle Unterschiede aufgrund von verschiedensten Einflüssen des menschlichen Organismus sein. Hierzu zählen u. a. das Alter, Erkrankungen oder genetische Faktoren. Da sich der Expressionsunterschied jedoch erst an Tag 3 offenbart hat, scheint letztere Erklärung unwahrscheinlich. Folglich ist ein seruminduzierter IL-7R α -Expressionsunterschied zwischen den beiden *Buffy Coats* am naheliegendsten, denn die Serumzusammensetzung kann sich auch innerhalb der gesunden Kontrollgruppe unterscheiden. Wir gehen in der Kontrollkohorte jedoch nicht von starken Serumunterschieden aus, da der IL-7R α -Expressionsunterschied erst am dritten Untersuchungstag nur zwischen zwei statt allen *Buffy Coats* auftrat und die gesunden Serumspender mit denselben Auswahlkriterien selektiert wurden.

Ein Vorteil dieser Studie ist, dass alle im Serum vorhandenen Mediatoren für die in vitro Kultivierung der T-Zellen genutzt wurden. Hierzu gehören sowohl die klassischen bekannten Zytokine als auch unbekannte Faktoren. Hiermit wurde eine Annäherung an das komplexe in vivo Serummilieu beabsichtigt. Dadurch ließ sich ermitteln, ob Serumfaktoren

für sich genommen für die erhöhte IL-7R α -Expression auf T1D-T-Zellen verantwortlich sind und welchen Einfluss sie auf die T-Zell-Differenzierung haben. Die Wirkung des Serums wurde zudem nicht durch eine externe Gabe von Wachstumsfaktoren oder weiteren Zytokinen beeinflusst. Da es sich hier um einen Serum-Assay handelt, untersucht die vorliegende Arbeit den Einfluss der systemisch-zirkulierenden Komponente auf den T-Zell-Phänotyp. Folglich kann keine Aussage bezüglich der potenziell ebenfalls beteiligten Gewebefaktoren getroffen werden.

Durch die Verwendung gesunder T-Zellen für die Versuche können die beschriebenen Effekte hauptsächlich auf die Serumfaktoren zurückgeführt werden. Weitere potenziell modulierende Einflussfaktoren wie die Krankheitsaktivität oder die Art der Therapie bei den T1D-Patienten wurden nicht untersucht. Ihr Einfluss sollte in weiteren Studien mittels u. a. Korrelationen und Stratifizierung bestimmt werden. Ein Einfluss dieser Faktoren auf die hier beschriebenen Resultate ist folglich nicht auszuschließen. Mithilfe des *Matchings* der Kontroll- und Patientengruppe konnte der Einfluss der Störfaktoren Alter und Geschlecht auf die Ergebnisse kontrolliert und Verzerrungen weitestgehend reduziert werden. Zudem ist der Median der BMI-Perzentilen zwischen beiden Gruppen vergleichbar gewesen.

Nicht unbedeutend sind die Limitationen der Durchflusszytometrie. Durch die variierende Anzahl gleichzeitig nutzbarer Fluorochrome können mehrere Charakterisierungen parallel durchgeführt werden. Allerdings bringt dies auch technische Herausforderungen mit sich, wie z. B. die Interferenz der Signale untereinander (sog. *spilling over*), was zur unerwünschten Signalregistrierung im benachbarten Kanal führen kann.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Regulation der IL-7R α -Expression auf T-Zellen ist bereits gut untersucht worden, bisher jedoch nicht der Einfluss von Serum auf diese. Unsere entsprechenden in vitro Untersuchungen ergaben, dass sich in Anwesenheit von Serum eine höchst unterschiedliche Regulation des IL-7R α auf den Referenz-T-Zellen darstellt. Es wurde dargestellt, dass das Serum von Typ-1-Diabetes-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu einer schwächeren Expression des IL-7R α auf Referenz-T-Zellen führt. Die Ergebnisse deuten somit nicht darauf hin, dass T1D-assoziierte Serumfaktoren für die zuvor beschriebene erhöhte IL-7R α -Expression auf CD4⁺-T-Zellen beim T1D verantwortlich sind. Ganz im Gegenteil könnte das Serum von T1D-Patienten noch zu identifizierende gegenregulatorische Faktoren enthalten, die eine erhöhte IL-7R α -Expression beim T1D teilweise kompensieren. Darüber hinaus wiesen die mit Patientenserum koinkubierten Referenz-T-Zellen eine geringere STAT3-Phosphorylierung auf; eine Korrelation mit dem IL-7R α -Expressionsniveau deckte keinen Zusammenhang auf. Folglich hat sich bestätigt, dass Serum einen signifikanten Einfluss auf die Regulation der IL-7R α -Expression ausübt. Daher sollte das T1D-assoziierte, pathologische Serumprofil in zukünftigen Studien eingehend untersucht werden, um Unterschiede in der Verteilung und den Serumspiegeln der Serumfaktoren zwischen gesunden Kontroll- und T1D-Serumproben zu bestimmen. Dabei sollten potenzielle Schlüsselfaktoren identifiziert werden, welche möglicherweise für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich sind.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Rosenbauer, J., et al., *Types of diabetes are not limited to age groups: type 1 diabetes in adults and type 2 diabetes in children and adolescents*. J Health Monit, 2019. **4**(2): p. 29-49.
2. Harjutsalo, V., L. Sjoberg, and J. Tuomilehto, *Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study*. Lancet, 2008. **371**(9626): p. 1777-82.
3. Baechle, C., et al., *Prevalence trends of type 1 and type 2 diabetes in children and adolescents in North Rhine-Westphalia, the most populous federal state in Germany, 2002-2020*. Diabetes Res Clin Pract, 2022. **190**: p. 109995.
4. Buchmann, M., et al., *Inzidenz, Prävalenz und Versorgung von Typ-1-Diabetes bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland: Zeittrends und sozialräumliche Lage*. Journal of Health Monitoring, 2023(2): p. 59--81.
5. Gregory, G.A., et al., *Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2022. **10**(10): p. 741-760.
6. Karvonen, M., et al., *Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. Diabetes Care, 2000. **23**(10): p. 1516-26.
7. Maahs, D.M., et al., *Epidemiology of type 1 diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. **39**(3): p. 481-97.
8. Stahl-Pehe, A., et al., *Trends in the incidence of type 1 diabetes and type 2 diabetes in children and adolescents in North Rhine-Westphalia, Germany, from 2002 to 2022*. Diabetes Metab, 2024. **50**(5): p. 101567.
9. Manuwald, U., et al., *Trends in incidence and prevalence of type 1 diabetes between 1999 and 2019 based on the Childhood Diabetes Registry of Saxony, Germany*. PLoS One, 2021. **16**(12): p. e0262171.
10. Chobot, A., et al., *Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase*. Diabet Med, 2017. **34**(9): p. 1252-1258.
11. Green, A., et al., *Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998*. Diabetologia, 2001. **44 Suppl 3**: p. B3-8.
12. Castillo-Reinado, K., et al., *Associations of area deprivation and urban/rural traits with the incidence of type 1 diabetes: analysis at the municipality level in North Rhine-Westphalia, Germany*. Diabet Med, 2020. **37**(12): p. 2089-2097.
13. Gregg, E.W., et al., *Trends in cause-specific mortality among adults with and without diagnosed diabetes in the USA: an epidemiological analysis of linked national survey and vital statistics data*. Lancet, 2018. **391**(10138): p. 2430-2440.
14. Carstensen, B., et al., *The Danish National Diabetes Register: trends in incidence, prevalence and mortality*. Diabetologia, 2008. **51**(12): p. 2187-96.
15. Lind, M., et al., *Mortality trends in patients with and without diabetes in Ontario, Canada and the UK from 1996 to 2009: a population-based study*. Diabetologia, 2013. **56**(12): p. 2601-8.
16. Chen, L., et al., *A systematic review of trends in all-cause mortality among people with diabetes*. Diabetologia, 2020. **63**(9): p. 1718-1735.
17. Driver, J.P., D.V. Serreze, and Y.G. Chen, *Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(1): p. 67-87.
18. Morran, M.P., et al., *Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus*. Mol Aspects Med, 2015. **42**: p. 42-60.
19. DiMeglio, L.A., C. Evans-Molina, and R.A. Oram, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2018. **391**(10138): p. 2449-2462.

20. Noble, J.A., *Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2015. **64**: p. 101-12.
21. Rewers, M. and J. Ludvigsson, *Environmental risk factors for type 1 diabetes*. Lancet, 2016. **387**(10035): p. 2340-2348.
22. Atkinson, M.A., *The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).
23. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
24. Ehlers, M.R. and M.R. Rigby, *Targeting memory T cells in type 1 diabetes*. Curr Diab Rep, 2015. **15**(11): p. 84.
25. Oling, V., et al., *Autoantigen-specific memory CD4+ T cells are prevalent early in progression to Type 1 diabetes*. Cell Immunol, 2012. **273**(2): p. 133-9.
26. Clark, M., C.J. Kroger, and R.M. Tisch, *Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1898.
27. Varela-Calvino, R., et al., *Apportioning Blame: Autoreactive CD4(+) and CD8(+) T Cells in Type 1 Diabetes*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017. **65**(4): p. 275-284.
28. Monti, P., et al., *Evidence for in vivo primed and expanded autoreactive T cells as a specific feature of patients with type 1 diabetes*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5785-92.
29. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
30. Calzascia, T., et al., *CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2999-3004.
31. Buckner, J.H. and G.T. Nepom, *Obstacles and opportunities for targeting the effector T cell response in type 1 diabetes*. J Autoimmun, 2016. **71**: p. 44-50.
32. Murphy, K. and C. Weaver, *Die adaptive Immunantwort*, in *Janeway Immunologie*. 2018, Springer Spektrum Berlin: Heidelberg. p. 473-496; 614-625.
33. Al Moussawy, M. and H. Abdelsamed, *Activated memory T cells cross-talk to naïve T cells: A mechanism for generation of autoreactive T cells*. The Journal of Immunology, 2023. **210**(Supplement_1): p. 170.17-170.17.
34. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
35. Bian, M.L., et al., *Reactivated CD4+Tm cells of T1D patients and siblings display an exaggerated effector phenotype with heightened sensitivity to activation-induced cell death*. Diabetes, 2015. **64**(6): p. 2161-71.
36. Orbán, T., et al., *Reduction in CD4 Central Memory T-Cell Subset in Costimulation Modulator Abatacept-Treated Patients With Recent-Onset Type 1 Diabetes Is Associated With Slower C-Peptide Decline*. Diabetes, 2014. **63**: p. 3449 - 3457.
37. de Jong, V.M., et al., *Variation in the CTLA4 3'UTR has phenotypic consequences for autoreactive T cells and associates with genetic risk for type 1 diabetes*. Genes Immun, 2016. **17**(1): p. 75-8.
38. Lawson, J.M., et al., *Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2008. **154**(3): p. 353-9.
39. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
40. Spanier, J.A., et al., *Increased Effector Memory Insulin-Specific CD4(+) T Cells Correlate With Insulin Autoantibodies in Patients With Recent-Onset Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2017. **66**(12): p. 3051-3060.
41. Burel, J.G., et al., *An Integrated Workflow To Assess Technical and Biological Variability of Cell Population Frequencies in Human Peripheral Blood by Flow Cytometry*. J Immunol, 2017. **198**(4): p. 1748-1758.
42. Han, Y., D. Liu, and L. Li, *PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(3): p. 727-742.

43. Akbar, A.N. and S.M. Henson, *Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity?* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 289-95.
44. Koch, S., et al., *Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people.* Immun Ageing, 2008. **5**(1): p. 6.
45. Frasca, D., et al., *Human peripheral late/exhausted memory B cells express a senescent-associated secretory phenotype and preferentially utilize metabolic signaling pathways.* Exp Gerontol, 2017. **87**(Pt A): p. 113-120.
46. Birch, J. and J. Gil, *Senescence and the SASP: many therapeutic avenues.* Genes Dev, 2020. **34**(23-24): p. 1565-1576.
47. Matteucci, E., et al., *Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4+ and CD8 + T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes.* J Clin Immunol, 2011. **31**(6): p. 977-84.
48. Garg, A.D., et al., *Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(1): p. 53-71.
49. Cunningham, A.J. and K.J. Lafferty, *A simple conservative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes.* Scand J Immunol, 1977. **6**(1-2): p. 1-6.
50. Azuma, M., *Co-signal Molecules in T-Cell Activation : Historical Overview and Perspective.* Adv Exp Med Biol, 2019. **1189**: p. 3-23.
51. Gimmi, C.D., et al., *Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6586-90.
52. Tai, Y., et al., *Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases.* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 642.
53. Schamel, W.W., et al., *Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response.* J Exp Med, 2005. **202**(4): p. 493-503.
54. Chen, K., et al., *Methyltransferase SETD2-Mediated Methylation of STAT1 Is Critical for Interferon Antiviral Activity.* Cell, 2017. **170**(3): p. 492-506 e14.
55. Zhang, Y., et al., *PARP9-DTX3L ubiquitin ligase targets host histone H2BJ and viral 3C protease to enhance interferon signaling and control viral infection.* Nat Immunol, 2015. **16**(12): p. 1215-27.
56. Stephanou, A. and D.S. Latchman, *STAT-1: a novel regulator of apoptosis.* Int J Exp Pathol, 2003. **84**(6): p. 239-44.
57. Ott, N., et al., *JAKs and STATs from a Clinical Perspective: Loss-of-Function Mutations, Gain-of-Function Mutations, and Their Multidimensional Consequences.* J Clin Immunol, 2023. **43**(6): p. 1326-1359.
58. Uzel, G., et al., *Dominant gain-of-function STAT1 mutations in FOXP3 wild-type immune dysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked-like syndrome.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(6): p. 1611-23.
59. Chaimowitz, N.S., et al., *STAT1 Gain of Function, Type 1 Diabetes, and Reversal with JAK Inhibition.* N Engl J Med, 2020. **383**(15): p. 1494-1496.
60. Russell, M.A., S.J. Richardson, and N.G. Morgan, *The role of the interferon/JAK-STAT axis in driving islet HLA-I hyperexpression in type 1 diabetes.* Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1270325.
61. Zhong, Z., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr., *Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6.* Science, 1994. **264**(5155): p. 95-8.
62. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells.* J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-9363.
63. Hillmer, E.J., et al., *STAT3 signaling in immunity.* Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **31**: p. 1-15.
64. Murray, P.J., *STAT3-mediated anti-inflammatory signalling.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1028-31.

65. Xiong, A., et al., *Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention*. Cancers (Basel), 2014. **6**(2): p. 926-57.
66. Yoshida, N., F. He, and V.C. Kytтарыs, *T cell-specific STAT3 deficiency abrogates lupus nephritis*. Lupus, 2019. **28**(12): p. 1468-1472.
67. Moosic, K.B., et al., *Presence of Activating STAT3 Mutations in the CD8+ T Cells of Rheumatoid Arthritis Patients*. Blood, 2022. **140**(Supplement 1): p. 11192-11193.
68. Warshauer, J.T., et al., *A human mutation in STAT3 promotes type 1 diabetes through a defect in CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med, 2021. **218**(8).
69. Fabbri, M., et al., *Type 1 Diabetes in STAT Protein Family Mutations: Regulating the Th17/Treg Equilibrium and Beyond*. Diabetes, 2019. **68**(2): p. 258-265.
70. Hand, T.W., et al., *Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(38): p. 16601-6.
71. Wingelhofer, B., et al., *Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer*. Leukemia, 2018. **32**(8): p. 1713-1726.
72. Nardelli, T.R., et al., *Prolactin protects against cytokine-induced beta-cell death by NFkappaB and JNK inhibition*. J Mol Endocrinol, 2018. **61**(1): p. 25-36.
73. Antov, A., et al., *Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3435-41.
74. Barata, J.T., S.K. Durum, and B. Seddon, *Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease*. Nat Immunol, 2019. **20**(12): p. 1584-1593.
75. Mackall, C.L., T.J. Fry, and R.E. Gress, *Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(5): p. 330-42.
76. Lundstrom, W., N.M. Fewkes, and C.L. Mackall, *IL-7 in human health and disease*. Semin Immunol, 2012. **24**(3): p. 218-24.
77. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
78. Leonard, W.J., J.X. Lin, and J.J. O'Shea, *The gamma(c) Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 832-850.
79. McElroy, C.A., et al., *Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2503-8.
80. Khaled, A.R. and S.K. Durum, *Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 817-30.
81. Kittipatarin, C. and A.R. Khaled, *Interlinking interleukin-7*. Cytokine, 2007. **39**(1): p. 75-83.
82. Swainson, L., et al., *IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1034-42.
83. Grenningloh, R., et al., *Ets-1 maintains IL-7 receptor expression in peripheral T cells*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 969-76.
84. Miller, M.L., et al., *Basal NF-kappaB controls IL-7 responsiveness of quiescent naive T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(20): p. 7397-402.
85. Ouyang, W., et al., *An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 358-71.
86. Moniuszko, M., et al., *Decreased CD127 expression on CD4+ T-cells and elevated frequencies of CD4+CD25+CD127- T-cells in children with long-lasting type 1 diabetes*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 459210.
87. Park, J.H., et al., *Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 289-302.
88. Read, K.A., et al., *IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4(+) T helper cell differentiation*. Exp Hematol, 2016. **44**(9): p. 799-808.
89. Gonnord, P., et al., *A hierarchy of affinities between cytokine receptors and the common gamma chain leads to pathway cross-talk*. Sci Signal, 2018. **11**(524): p. eaal1253.

90. Shochat, C., et al., *Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor-alpha (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias*. J Exp Med, 2011. **208**(5): p. 901-8.
91. Zenatti, P.P., et al., *Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Nat Genet, 2011. **43**(10): p. 932-9.
92. Puel, A., et al., *Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency*. Nat Genet, 1998. **20**(4): p. 394-7.
93. Henriques, C.M., et al., *IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3269-77.
94. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
95. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
96. Kondrack, R.M., et al., *Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1797-806.
97. Li, J., G. Huston, and S.L. Swain, *IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1807-15.
98. Kaech, S.M., et al., *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1191-8.
99. Walsh, S.T., *Structural insights into the common gamma-chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway*. Immunol Rev, 2012. **250**(1): p. 303-16.
100. Matsue, H., P.R. Bergstresser, and A. Takashima, *Keratinocyte-derived IL-7 serves as a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice*. Journal of immunology, 1993. **151** **11**: p. 6012-9.
101. Thang, P.H., et al., *The role of IL-1beta in reduced IL-7 production by stromal and epithelial cells: a model for impaired T-cell numbers in the gut during HIV-1 infection*. J Intern Med, 2010. **268**(2): p. 181-93.
102. Watanabe, M., et al., *Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2945-53.
103. Martin, C.E., et al., *Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells*. Immunity, 2017. **47**(1): p. 171-182 e4.
104. Al-Shami, A., et al., *A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 159-68.
105. Appasamy, P.M., *Biological and clinical implications of interleukin-7 and lymphopoiesis*. Cytokines Cell Mol Ther, 1999. **5**(1): p. 25-39.
106. Dardalhon, V., et al., *IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9277-82.
107. Guimond, M., et al., *Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 149-57.
108. Fry, T.J., et al., *A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis*. Blood, 2001. **97**(10): p. 2983-90.
109. Napolitano, L.A., et al., *Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 73-9.
110. Bolotin, E., et al., *Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(8): p. 783-8.
111. McElroy, C.A., J.A. Dohm, and S.T. Walsh, *Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7Ralpha complex*. Structure, 2009. **17**(1): p. 54-65.
112. Rochman, Y., et al., *Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19455-60.

113. Le Saout, C., et al., *IL-7-dependent STAT1 activation limits homeostatic CD4⁺ T cell expansion*. JCI Insight, 2017. **2**(22).
114. Lin, J.X., et al., *The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 331-9.
115. Jiang, Q., et al., *Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(14): p. 6501-13.
116. Opferman, J.T., et al., *Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 671-6.
117. Kimura, M.Y., et al., *IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8(+) T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death*. Nat Immunol, 2013. **14**(2): p. 143-51.
118. Hartgring, S.A., et al., *Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(9): p. 2595-605.
119. Haas, J., et al., *The interleukin-7 receptor alpha chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis*. Eur J Immunol, 2011. **41**(3): p. 845-53.
120. Meyer, A., P.J. Parmar, and S. Shahrara, *Significance of IL-7 and IL-7R in RA and autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2022. **21**(7): p. 103120.
121. Lundtoft, C., J. Seyfarth, and M. Jacobsen, *IL7RA genetic variants differentially affect IL-7Ralpha expression and alternative splicing: a role in autoimmune and infectious diseases?* Genes Immun, 2020. **21**(2): p. 83-90.
122. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32.
123. Gupta, S., K. Cerosaletti, and S.A. Long, *Renegade homeostatic cytokine responses in T1D: drivers of regulatory/effector T cell imbalance*. Clin Immunol, 2014. **151**(2): p. 146-54.
124. Seyfarth, J., et al., *Dominant TNFalpha and impaired IL-2 cytokine profiles of CD4(+) T cells from children with type-1 diabetes*. Immunol Cell Biol, 2017. **95**(7): p. 630-639.
125. Heninger, A.K., et al., *IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells*. J Immunol, 2012. **189**(12): p. 5649-58.
126. Hanafusa, T., et al., *The NOD mouse*. Diabetes Res Clin Pract, 1994. **24 Suppl**: p. S307-11.
127. Doms, H., *Interleukin-7: Fuel for the autoimmune attack*. J Autoimmun, 2013. **45**: p. 40-8.
128. Penaranda, C., et al., *IL-7 receptor blockade reverses autoimmune diabetes by promoting inhibition of effector/memory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. 12668-73.
129. Lee, L.F., et al., *Anti-IL-7 receptor-alpha reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. 12674-9.
130. Seddon, B., P. Tomlinson, and R. Zamoyska, *Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 680-6.
131. van Roon, J.A., et al., *Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(2): p. 113-9.
132. Bikker, A., et al., *Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome correlates with increased inflammation*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(4): p. 969-77.
133. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(4): p. 557-63.
134. Coers, J., M.N. Starnbach, and J.C. Howard, *Modeling infectious disease in mice: co-adaptation and the role of host-specific IFNgamma responses*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000333.

135. Monti, P., et al., *Concentration and activity of the soluble form of the interleukin-7 receptor alpha in type 1 diabetes identifies an interplay between hyperglycemia and immune function*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2500-8.
136. Hoe, E., et al., *Functionally significant differences in expression of disease-associated IL-7 receptor alpha haplotypes in CD4 T cells and dendritic cells*. J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2512-7.
137. Jager, J., et al., *IL7RA haplotype-associated alterations in cellular immune function and gene expression patterns in multiple sclerosis*. Genes Immun, 2013. **14**(7): p. 453-61.
138. Todd, J.A., et al., *Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 857-64.
139. Hoe, E., et al., *Interleukin 7 receptor alpha chain haplotypes vary in their influence on multiple sclerosis susceptibility and response to interferon Beta*. J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(5): p. 291-8.
140. Seyfarth, J., et al., *Interleukin-7 receptor alpha-chain haplotypes differentially affect soluble IL-7 receptor and IL-7 serum concentrations in children with type 1 diabetes*. Pediatr Diabetes, 2018. **19**(5): p. 955-962.
141. Hoffmann, M., et al., *Interleukin-7 and soluble Interleukin-7 receptor levels in type 1 diabetes - Impact of IL7RA polymorphisms, HLA risk genotypes and clinical features*. Clin Immunol, 2022. **235**: p. 108928.
142. Cote, S., et al., *Complexed soluble IL-7 receptor alpha and IL-7 increase IL-7-mediated proliferation and viability of CD8(+) T-cells in vitro*. Cell Immunol, 2015. **293**(2): p. 122-5.
143. Lundstrom, W., et al., *Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(19): p. E1761-70.
144. Gregory, S.G., et al., *Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis*. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1083-91.
145. McKay, F.C., et al., *Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis*. Genes Immun, 2008. **9**(1): p. 1-6.
146. Ghazawi, F.M., et al., *Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins are induced by IL-7 and target surface CD127 protein for degradation in human CD8 T cells*. Cell Immunol, 2016. **306-307**: p. 41-52.
147. Korte, A., et al., *Expression analysis and characterization of alternatively spliced transcripts of human IL-7R α chain encoding two truncated receptor proteins in relapsed childhood all*. Cytokine, 2000. **12**(11): p. 1597-1608.
148. Goodwin, R.G., et al., *Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily*. Cell, 1990. **60**(6): p. 941-51.
149. Rose, T., et al., *Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7389-97.
150. Lundtoft, C., et al., *Aberrant plasma IL-7 and soluble IL-7 receptor levels indicate impaired T-cell response to IL-7 in human tuberculosis*. PLoS Pathog, 2017. **13**(6): p. e1006425.
151. Seyfarth, J., et al., *CD4(+) T-Cells With High Common gamma Chain Expression and Disturbed Cytokine Production Are Enriched in Children With Type-1 Diabetes*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 820.
152. Hehenkamp, P., et al., *Interleukin-7-dependent nonclassical monocytes and CD40 expression are affected in children with type 1 diabetes*. Eur J Immunol, 2021. **51**(12): p. 3214-3227.
153. Herold, K.C., et al., *Immunomodulatory activity of humanized anti-IL-7R monoclonal antibody RN168 in subjects with type 1 diabetes*. JCI Insight, 2019. **4**(24).
154. Xue, H.H., et al., *GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1036-44.
155. Tal, N., et al., *Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(3): p. 365-78.

156. Franchimont, D., et al., *Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2212-8.
157. Faller, E.M., et al., *IL-7 induces clathrin-mediated endocytosis of CD127 and subsequent degradation by the proteasome in primary human CD8 T cells*. Immunol Cell Biol, 2016. **94**(2): p. 196-207.
158. Mazzucchelli, R.I., A. Riva, and S.K. Durum, *The human IL-7 receptor gene: Deletions, polymorphisms and mutations*. Seminars in Immunology, 2012. **24**(3): p. 225-230.
159. Galarza-Munoz, G., et al., *Human Epistatic Interaction Controls IL7R Splicing and Increases Multiple Sclerosis Risk*. Cell, 2017. **169**(1): p. 72-84 e13.
160. Venkitaraman, A.R. and R.J. Cowling, *Interleukin 7 receptor functions by recruiting the tyrosine kinase p59fyn through a segment of its cytoplasmic tail*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 12083-7.
161. Luo, H., et al., *Efnb1 and Efnb2 proteins regulate thymocyte development, peripheral T cell differentiation, and antiviral immune responses and are essential for interleukin-6 (IL-6) signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41135-41152.
162. Luo, H., et al., *Ephrinb1 and Ephrinb2 are associated with interleukin-7 receptor alpha and retard its internalization from the cell surface*. J Biol Chem, 2011. **286**(52): p. 44976-87.
163. Klimontov, V.V., et al., *Serum Cytokines and Growth Factors in Subjects with Type 1 Diabetes: Associations with Time in Ranges and Glucose Variability*. Biomedicines, 2023. **11**(10): p. 2843.
164. Xue, H.H., et al., *IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13759-64.
165. Chen, Y.L., et al., *Correlation between serum interleukin-6 level and type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis*. Cytokine, 2017. **94**: p. 14-20.
166. Snell-Bergeon, J.K., et al., *Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(6): p. 2868-76.
167. Galassetti, P.R., et al., *Inflammatory cytokine, growth factor and counterregulatory responses to exercise in children with type 1 diabetes and healthy controls*. Pediatr Diabetes, 2006. **7**(1): p. 16-24.
168. Lo, H.C., S.C. Lin, and Y.M. Wang, *The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus*. Clin Biochem, 2004. **37**(8): p. 666-72.
169. Wędrychowicz, A., H. Działkowiak, and K. Sztefko. *Interleukin-6 (IL-6) and IGF-IGFBP system in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus*. in *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2004.
170. Kikodze, N., et al., *Cytokines and T regulatory cells in the pathogenesis of type 1 diabetes*. Georgian Med News, 2013(222): p. 29-35.
171. Kuczynski, S., et al., *IL-15 is elevated in serum patients with type 1 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. **69**(3): p. 231-6.
172. Dos Santos Haber, J.F., et al., *The Relationship between Type 1 Diabetes Mellitus, TNF-alpha, and IL-10 Gene Expression*. Biomedicines, 2023. **11**(4).
173. Qiao, Y.C., et al., *The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176157.
174. Alizadeh, B.Z., et al., *Association of interferon-gamma and interleukin 10 genotypes and serum levels with partial clinical remission in type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(3): p. 480-4.
175. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
176. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. Science, 1994. **265**(5176): p. 1237-40.
177. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.

178. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
179. Azar, S.T., et al., *Alterations in plasma transforming growth factor beta in normoalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4680-2.
180. Nguyen, T.P. and S.F. Sieg, *TGF-beta inhibits IL-7-induced proliferation in memory but not naive human CD4(+) T cells*. J Leukoc Biol, 2017. **102**(2): p. 499-506.
181. Ouyang, W., et al., *TGF-beta cytokine signaling promotes CD8+ T cell development and low-affinity CD4+ T cell homeostasis by regulation of interleukin-7 receptor alpha expression*. Immunity, 2013. **39**(2): p. 335-46.
182. Kleinhenz, M.E., et al., *Suppression of lymphocyte responses by tuberculous plasma and mycobacterial arabinogalactan. Monocyte dependence and indomethacin reversibility*. J Clin Invest, 1981. **68**(1): p. 153-62.
183. Bio-Rad Laboratories, I., *Principles of the Flow Cytometer*, in *Flow Cytometry Basics Guide* Bio-Rad Laboratories, Inc. p. 3-10.
184. Bio-Rad Laboratories, I., *Principles of Fluorescence*, in *Flow Cytometry Basics Guide*. Bio-Rad Laboratories, Inc. p. 11-18.
185. Chen, D., et al., *Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 747324.
186. Ahor, H.S., et al., *Monocyte pathology in human tuberculosis is due to plasma milieu changes and aberrant STAT signalling*. Immunology, 2023. **170**(1): p. 154-166.
187. Mikulkova, Z., et al., *Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis*. Cell Immunol, 2010. **262**(2): p. 75-9.
188. Devarajan, P. and Z. Chen, *Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good*. Immunol Res, 2013. **57**(1-3): p. 12-22.
189. Harelimana, J.D., et al., *Cytokine-induced transient monocyte IL-7Ra expression and the serum milieu in tuberculosis*. Eur J Immunol, 2022. **52**(6): p. 958-969.
190. Hartigan-O'Connor, D.J., et al., *Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells*. J Immunol Methods, 2007. **319**(1-2): p. 41-52.
191. Nemes, E., et al., *Immunophenotype of HIV+ patients during CD4 cell-monitored treatment interruption: role of the IL-7/IL-7 receptor system*. AIDS, 2006. **20**(16): p. 2021-32.
192. Zhang, B., et al., *CD127 imprints functional heterogeneity to diversify monocyte responses in inflammatory diseases*. J Exp Med, 2022. **219**(2).
193. Gonzalez-Quintial, R., et al., *Systemic autoimmunity and lymphoproliferation are associated with excess IL-7 and inhibited by IL-7Ralpha blockade*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27528.
194. Appay, V., et al., *Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5954-8.
195. Zaunders, J.J., et al., *Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1660-7.
196. Zaunders, J.J., Y. Levy, and N. Seddiki, *Exploiting differential expression of the IL-7 receptor on memory T cells to modulate immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(4): p. 391-401.
197. Powell, N., et al., *Transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by innate lymphoid cells with the interleukin-7 receptor*. The Lancet, 2013. **381**.
198. Sasson, S.C., et al., *Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2006. **193**(4): p. 505-14.
199. Sasson, S.C., J.J. Zaunders, and A.D. Kelleher, *The IL-7/IL-7 receptor axis: understanding its central role in T-cell homeostasis and the challenges facing its utilization as a novel therapy*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(12): p. 1571-82.

- 200. Long, S.A., et al., *Remodeling T cell compartments during anti-CD3 immunotherapy of type 1 diabetes*. Cell Immunol, 2017. **319**: p. 3-9.
- 201. Rosenzweig, M., et al., *Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients*. J Autoimmun, 2015. **58**: p. 48-58.
- 202. Battle, T.E. and D.A. Frank, *The role of STATs in apoptosis*. Curr Mol Med, 2002. **2**(4): p. 381-92.
- 203. Pirot, P., A.K. Cardozo, and D.L. Eizirik, *Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008. **52**(2): p. 156-65.
- 204. Callewaert, H.I., et al., *Deletion of STAT-1 pancreatic islets protects against streptozotocin-induced diabetes and early graft failure but not against late rejection*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2169-73.

Abbildungsverzeichnis

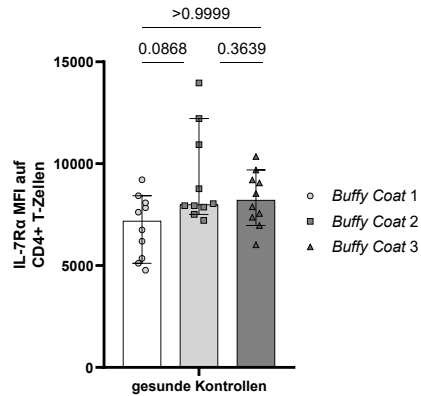
Abb. 1: Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppen-Charakteristika	30
Abb. 2: Graphische Darstellung des experimentellen Designs.....	31
Abb. 3: Gating-Strategie der zu untersuchenden Zielpopulationen	38
Abb. 4: Gating-Strategie der pSTAT-Moleküle.....	38
Abb. 5: Serum-induzierte IL-7R α -Expression auf CD4 ⁺ -T-Zellen im Zeitverlauf	42
Abb. 6: Kohortenvergleich der IL-7R α -Expression auf CD4 ⁺ -T-Zellen	43
Abb. 7: Expression vom IL-7R α auf T-Zell- <i>Memory-Subsets</i>	44
Abb. 8: Kohorten-Unterschiede in der Zusammensetzung der T-Zell- <i>Memory-Subsets</i>	46
Abb. 9: IL-7R α -Expression auf T-Zell- <i>Memory-Subsets</i> im Kohortenvergleich	48
Abb. 10: Absolute Differenzen der IL-7R α -Expression der T-Zell- <i>Memory-Subsets</i> im Vergleich ..	50
Abb. 11: Expressionslevel von phosphorylierten STAT-Proteinen im Vergleich	51
Abb. 12: Korrelation von pSTAT3 mit der IL-7R α -Expression im Vergleich	52
Abb. 13: Korrelation von pSTAT3 mit der Differenz der IL-7R α -Expression im Vergleich	53

Tabellenverzeichnis

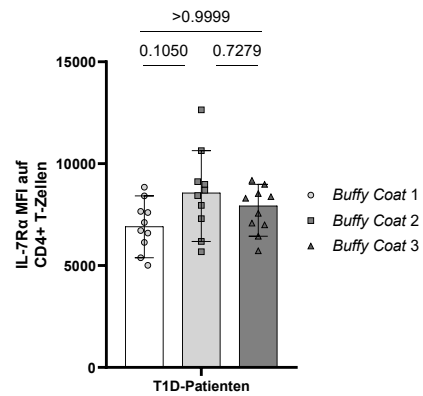
Tabelle 1: Verwendete Geräte	21
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsartikel	22
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	23
Tabelle 4: Verwendete Medien	24
Tabelle 5: Zusammensetzung des T-Zell-Isolationsmediums	25
Tabelle 6: Zusammensetzung des RPMI-Basismediums.....	25
Tabelle 7: Humanreaktive Antikörper	25
Tabelle 8: Verwendete <i>Kits</i> und Stimulanzen	27
Tabelle 9: Verwendete <i>Software</i>	27
Tabelle 10: Darstellung des Studienkollektivs	40

Anhang

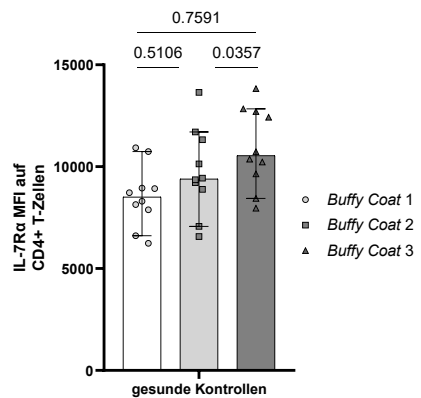
Unterschiede in der IL-7R α -Expression der *Buffy Coats* - Tag 1



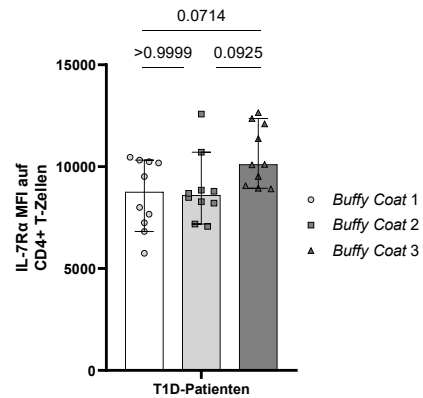
Unterschiede in der IL-7R α -Expression der *Buffy Coats* - Tag 1



Unterschiede in der IL-7R α -Expression der *Buffy Coats* - Tag 3



Unterschiede in der IL-7R α -Expression der *Buffy Coats* - Tag 3



Anhang 1: Vergleich der IL-7R α -Expression auf CD4+-Referenz-T-Zellen zwischen den verschiedenen *Buffy Coats*

In die verschiedenen *Buffy Coats* separierte Darstellung der seruminduzierten IL-7R α -Expression CD4+-Referenz-T-Zellen nach ein- bzw. dreitägiger Inkubation in gesundem Kontroll- bzw. T1D-Serum. Getrennte Darstellung des Medians je *Buffy Coat* in Säulendiagrammen mit Einzelwertdarstellung in unterschiedlich gefärbten Symbolen siehe Legende (hellgrauer Kreis: *Buffy Coat* 1, mittelgraues Quadrat: *Buffy Coat* 2, dunkelgraues Dreieck: *Buffy Coat* 3) und *Whiskers*, die das 95 %-Konfidenzintervall umfassen. *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) auf der y-Achse (lineare Skalierung), Kohorte auf der x-Achse. Angabe des entsprechenden p-Wertes erfolgte über einem horizontalen Strich (*Dunn's multiple comparison-Test*).

Danksagung

Meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Julia Seyfarth danke ich herzlich für die Überlassung des spannenden Themas sowie die umfängliche Betreuung und das Mentoring während des Projektes. Ihre wissenschaftliche Expertise und Begeisterung haben mich fasziniert und waren sehr motivierend. Gleichzeitig möchte ich meinem Co-Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Max Anstötz für die Unterstützung, unkomplizierten Absprachen und Kooperationsangebote danken.

Ich möchte meinem Gruppenleiter Prof. Dr. Marc Jacobsen meine tiefe Wertschätzung ausdrücken. Die gemeinsamen Besprechungen und Diskussionen waren sehr bereichernd. Seine bedeutenden Beiträge haben das Projekt maßgeblich vorangetrieben.

Ein weiterer großer Dank gilt den Mitgliedern der AG Jacobsen: Wilfred, Hubert, Jean, Ju-Young, Maïke, Monika, Steffen, Sarah und Katharina. Ich danke für die herzliche Unterstützung und Anleitung während der Durchführung des Projektes. Ihre stete Hilfsbereitschaft war für mich von großer Bedeutung. Es hat mir eine große Freude gemacht, mit ihnen arbeiten zu dürfen! Ebenfalls bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Stoffwechsellabors für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den wertschätzenden Umgang miteinander.

Besonderen Dank schulde ich meinem Teampartner Wilfred Aniagyei. Ich danke ihm für seine Geduld und tatkräftige Unterstützung während der Planung, Umsetzung und des Abschlusses des Projektes. Ohne ihn wäre all dies nicht möglich gewesen. Ich wünsche ihm alles Gute für seinen weiteren wissenschaftlichen Werdegang!

Dem Team der Klinik für allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Mayatepek möchte ich ebenfalls danken für die Unterstützung meiner Arbeit, insbesondere in Hinblick auf die zur Verfügung gestellten Proben und klinischen Daten. Der Medical Research School danke ich für die hilfreichen angebotenen Kurse und das wissenschaftliche Werkzeug.

Ein spezieller Dank geht an meine Familie für die bedingungslose und moralische Unterstützung, aufbauenden Worte und Ratschläge in allen Abschnitten der Arbeit.