

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

**Charakterisierung der IL-2- und IL-7-Rezeptor-Expression
auf CD4+ T-Zellen von T1D-PatientInnen und gesunden
Kontrollen aus Deutschland und Ghana**

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Sarah Bittner

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Jacobsen

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen M. Floß

Phil 4:13

Zusammenfassung

Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine der häufigsten chronischen Stoffwechselerkrankungen des Kindes- und Jugendalters und stellt weltweit eine Erkrankung mit zunehmender Relevanz dar. In der T1D-Pathogenese kommt es zu einer autoimmunen Zerstörung Insulin-seziernder β -Zellen des Pankreas. Hierbei spielen sowohl autoreaktive T-Zellen als auch ein Missverhältnis von regulatorischen und Effektor-T-Zellen, die durch ihre spezifische Interleukin-2- (IL-2) und Interleukin-7- (IL-7) Rezeptor-Expression charakterisiert werden, eine wichtige Rolle. Die Expression des IL-2-Rezeptor- α „CD25“ (*Cluster of differentiation 25*) ist charakteristisch für regulatorische T-Zellen, wohingegen die Expression des IL-7-Rezeptor- α „CD127“ (*Cluster of differentiation 127*) relevant für die Entwicklung und das Überleben von Effektor-T-Zellen ist. T-Zellen, die sowohl den IL-2- als auch den IL-7-Rezeptor- α exprimieren, wurden bisher als antiinflammatorisch wirkende Zellen beschrieben. Zudem konnte der Anteil doppeltpositiver CD4+ (*Cluster of differentiation 4*) T-Zellen zum Manifestationszeitpunkt mit dem Erhalt der β -Zell-Funktion sowie einer längeren partiellen Remissionsphase in T1D-PatientInnen in Zusammenhang gebracht werden. Ob die doppeltpositiven CD4+ T-Zellen auch eine Rolle bei Langzeit-T1D-PatientInnen spielen und mit einem unterschiedlichen klinischen Verlauf des Diabetes assoziiert sind, ist bislang unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die IL-2- und IL-7-Rezeptor-Expression auf CD4+ T-Zellen in zwei voneinander unabhängigen Kohorten von T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen zu charakterisieren und diese mit klinischen Parametern zu assoziieren. Dazu wurden im Rahmen einer Querschnitts-Kohortenstudie unserer Arbeitsgruppe ProbandInnen in Kumasi, Ghana und in Düsseldorf rekrutiert. Anhand der Parameter Alter, Geschlecht und BMI (*Body mass index*) wurden für diese Arbeit zwei Studienkohorten, bestehend aus je 84 T1D-PatientInnen und passenden, gesunden Kontrollen in Kumasi sowie aus je 56 T1D-PatientInnen und passenden, gesunden Kontrollen in Düsseldorf ausgewählt. Es erfolgten die Entnahme von heparinisiertem Vollblut, eine Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC), eine *ex-vivo*-Antikörper-Färbung sowie die anschließende durchflusszytometrische Immunphänotypisierung. Zuletzt wurden die Immunphänotypisierungsdaten mit zuvor erhobenen klinischen Parametern der ProbandInnen assoziiert. In der Analyse zeigte sich konsistent in beiden Kohorten eine vermehrte CD127 Expression auf CD4+ T-Zellen von T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen. Dabei fiel auf, dass im Vergleich zu Gesunden in der ghanaischen Kohorte ein größerer Anteil doppeltpositiver (CD25+/CD127+) T-Zellen, in der deutschen Kohorte dagegen ein größerer Anteil einfachpositiver (CD25-/CD127+) T-Zellen zu finden war. Darüber hinaus fanden sich sowohl zwischen T1D-PatientInnen und Kontrollen als auch im Ländervergleich Unterschiede im Anteil von naiven und Gedächtnis-T-Zellen, die eine unterschiedliche CD25/CD127 Expression aufwiesen. Zusätzlich konnten auch auf spezifischen *Memory Subsets* in T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen ein vermehrter Anteil von doppeltpositiven (Ghana) und einfachpositiven (Deutschland) CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden. Bei Assoziation doppel- und einfachpositiver T-Zellen mit klinischen Parametern korrelierten diese in ghanaischen T1D-PatientInnen jeweils entgegengesetzt mit den Parametern Alter, Manifestationsalter, Erkrankungsdauer und HbA1c, was eine unterschiedliche Funktion beider T-Zellgruppen nahelegt. Die vorliegende Arbeit dient der Erweiterung des Wissensstandes über die IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression auf CD4+ T-Zellen von T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen. Diese Informationen können hilfreich für die Weiterentwicklung von IL-2- und IL-7-assoziierten Immuntherapien zur kausalen Behandlung des T1D sein.

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is one of the most common chronic metabolic diseases of childhood and adolescence and is a disease of increasing relevance worldwide. In T1D pathogenesis, autoimmune destruction of insulin-secreting pancreatic β -cells occurs. Thereby autoreactive T cells and a mismatch of regulatory and effector T cells, characterized by their specific Interleukin-2 (IL-2) and Interleukin-7 (IL-7) receptor expression, play an important role. The expression of the IL-2 receptor α “CD25” (cluster of differentiation 25) is characteristic for regulatory T cells, whereas the expression of the IL-7 receptor α “CD127” (cluster of differentiation 127) is relevant for the development and survival of effector T cells. T cells expressing both, the IL-2 and IL-7 receptor α , have previously been described as anti-inflammatory cells. In addition, the expression of double-positive CD4⁺ (cluster of differentiation 4) T cells at T1D onset has been associated with the preservation of β -cell function and a longer partial remission phase in T1D patients. Whether double-positive CD4⁺ T cells also play a role in long-term T1D patients and are associated with a different clinical course of diabetes is still unknown. Therefore, the objective of this work was to characterize the IL-2 and IL-7 receptor expression on CD4⁺ T cells in two independent cohorts of T1D patients and healthy controls and to associate these with clinical parameters. For this purpose, subjects were recruited in Kumasi, Ghana and Düsseldorf, Germany as a part of a cross-sectional cohort study conducted by our working group. Based on the parameters of age, gender and BMI (body mass index), two study cohorts were selected for this work, consisting of 84 T1D patients and 84 matched healthy controls in Kumasi and 56 T1D patients and 56 matched healthy controls in Düsseldorf. Thereby heparinized blood was collected, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and subsequent flow cytometric immunophenotyping was performed. Finally the immunophenotyping data were associated with previously collected clinical parameters. The analysis consistently showed increased CD127 expression on CD4⁺ T cells of T1D patients compared to controls in both cohorts. It was noticeable that, compared to healthy individuals, a larger proportion of double-positive (CD25⁺/CD127⁺) T cells were found in the Ghanaian cohort, whereas a larger proportion of single-positive (CD25⁻/CD127⁺) T cells were found in the German cohort. Furthermore differences in the proportion of naive and memory T cells with different CD25/CD127 expression were found between T1D patients and controls as well as between countries. In addition, an increased proportion of double-positive (Ghana) and single-positive (Germany) CD4⁺ T cells was also detected on specific memory subsets in the comparison between T1D patients and controls. When double- and single-positive T cells were associated with clinical parameters in Ghanaian T1D patients, they correlated inversely with the parameters age, age of onset, duration of disease and HbA1c, suggesting a different function of both T-cell groups. This dissertation serves to expand the state of knowledge on IL-2 and IL-7 receptor α expression on CD4⁺ T cells in T1D patients and healthy controls. This information may be helpful for the further development of IL-2 and IL-7 associated immunotherapies for the casual treatment of T1D.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cγ	<i>Common gamma Kette</i>
DE	Deutschland
DDZ	Deutsches Diabeteszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
(D)-PBS	<i>(Dulbecco's) Phosphate Buffered Saline</i>
FACS	<i>Flourescence activated cell sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter-Area</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter-Height</i>
GER	<i>Germany</i>
GHA	Ghana
IL	Interleukin
IL-2	Interleukin 2
IL-7	Interleukin 7
KATH	<i>Komfo Anokye Teaching Hospital</i>
KCCR	<i>Kumasi Centre for Collaborative Research</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
NOD	<i>Non-obese diabetes</i>
p	Signifikanzwert
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PR	Partielle Remissionsphase

r	Rangkorrelationskoeffizient
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
SSC-A	<i>Sideward Scatter-Area</i>
T1D	Typ-1-Diabetes
T_{CM}	Zentrale Gedächtnis-T-Zellen
T_{eff}	Effektor-T-Zellen
T_{EM}	Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
T_{EMRA}	Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, die CD45RA re-exprimieren
Th	T-Helferzellen
T_N	Naive T-Zellen
Treg	Regulatorische T-Zellen
Via	Viabilität

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	TYP-1-DIABETES.....	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2	<i>Unterschiede in Europa und Subsahara-Afrika</i>	1
1.2	PATHOGENESE DES T1D.....	2
1.2.1	<i>Einführung in die T1D-Pathogenese</i>	2
1.2.2	<i>T-Zellen in der T1D-Pathogenese</i>	3
1.2.3	<i>Klassifizierung naiver und Gedächtnis-T-Zellen</i>	4
1.2.4	<i>Funktion naiver und Gedächtnis-T-Zellen</i>	4
1.3	EINFÜHRUNG DES INTERLEUKIN-2-REZEPTORS.....	5
1.3.1	<i>Aufbau und Vorkommen</i>	5
1.3.2	<i>Funktion und Rolle im T1D</i>	6
1.4	EINFÜHRUNG DES INTERLEUKIN-7-REZEPTORS.....	7
1.4.1	<i>Aufbau und Vorkommen</i>	7
1.4.2	<i>Funktion und Rolle im T1D</i>	8
1.5	BEDEUTUNG DER IL-2- UND IL-7-REZEPTOR-EXPRESSION IN DER T1D-PATHOGENESE.....	8
1.6	ZIELE DER ARBEIT	9
2	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	MATERIAL.....	10
2.1.1	<i>Laborgeräte und Ausstattung</i>	10
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	11
2.1.3	<i>Chemikalien</i>	12
2.1.4	<i>Medien</i>	12
2.1.5	<i>Antikörper</i>	13
2.1.6	<i>Software</i>	13
2.1.7	<i>Spenderzellen</i>	14
2.2	METHODEN	14
2.2.1	<i>ProbandInnenrekrutierung</i>	14
2.2.2	<i>PBMC-Isolation</i>	15
2.2.3	<i>Zellzahlbestimmung</i>	15
2.2.4	<i>Kryokonservierung</i>	16
2.2.5	<i>Antikörperfärbung</i>	16
2.2.6	<i>Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung</i>	18
2.2.7	<i>Auswertung der Oberflächenmarker</i>	19
2.2.8	<i>Erfassung klinischer Parameter</i>	22
2.2.9	<i>Einteilung der StudienteilnehmerInnen</i>	22
2.2.10	<i>Statistische Analyse</i>	23
2.2.11	<i>Aktenzeichen der Ethikvota</i>	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	IL-2- UND IL-7-REZEPTOR-A-EXPRESSION AUF CD4+ T-ZELLEN.....	24
3.2	IL-2- UND IL-7-REZEPTOR-A-EXPRESSION AUF NAIVEN UND GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN	28
3.3	PROPORTIONEN VON NAIVEN UND GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN IN T1D-PATIENTINNEN UND KONTROLLEN.....	30
3.4	IL-2- UND IL-7-REZEPTOR-A-EXPRESSION AUF NAIVEN UND GEDÄCHTNIS-T-ZELLEN IN T1D-PATIENTINNEN UND KONTROLLEN	31
3.5	ASSOZIATION DER IL-2- UND IL-7-REZEPTOR-A-EXPRESSION MIT DEM KLINISCHEN PHÄNOTYP DER PROBANDINNEN.....	32
3.5.1	<i>Alter bei Rekrutierung</i>	32
3.5.2	<i>Manifestationsalter</i>	33
3.5.3	<i>Erkrankungsdauer</i>	34
3.5.4	<i>HbA1c</i>	35
3.6	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	36

4	DISKUSSION	38
4.1	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	38
4.1.1	<i>Erhöhte Expression der IL-7-Rezeptor-α-Kette in T1D-PatientInnen</i>	<i>38</i>
4.1.2	<i>Starke Variation der IL-2- und IL-7-Rezeptor-α-Expression auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen</i>	<i>40</i>
4.1.3	<i>Unterschiedliche Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen in T1D-PatientInnen und Kontrollen</i>	<i>41</i>
4.1.4	<i>Spezifische Memory Subsets zeigen eine unterschiedliche IL-2- und IL-7-Rezeptor-α-Expression in T1D-PatientInnen und Kontrollen.....</i>	<i>42</i>
4.1.5	<i>Der klinische Phänotyp von T1D-PatientInnen und Kontrollen korreliert mit der Expression der IL-2- und IL-7-Rezeptor-α-Kette.....</i>	<i>43</i>
4.2	LIMITATIONEN	44
4.3	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	45
5	LITERATURVERZEICHNIS	46
6	ANHANG.....	57
7	DANKSAGUNG.....	

1 Einleitung

1.1 Typ-1-Diabetes

1.1.1 Epidemiologie

Typ-1-Diabetes (T1D) ist die am weitesten verbreitete Diabetes-Form bei Kindern und Jugendlichen [1, 2] und gilt als eine der häufigsten chronischen Stoffwechselerkrankungen des Kindes- und Jugendalters. [3-5] Circa 5-10% aller Diabeteserkrankungen weltweit werden derzeit als T1D klassifiziert. [1] Somit sind nach aktuellem Kenntnisstand circa 7-10% der Weltbevölkerung von Typ-1-Diabetes betroffen [6] und darunter weltweit circa 1,5 Millionen T1D-Fälle im Alter unter 20 Jahren bekannt. [7] Eine T1D-Manifestation im Erwachsenenalter erfolgt in westlichen Ländern seltener als im Kindesalter. [8, 9] Warum manche PatientInnen im Kindesalter und andere im Erwachsenenalter erkranken, ist jedoch derzeit noch unbekannt. Prävalenz und Inzidenz steigen weltweit, vor allem im Alter unter fünf Jahren. [10-13] Im Laufe der letzten Jahre wurde dabei im Kindesalter ein Anstieg der Inzidenz um circa 2,8 bis 3,9% pro Jahr erfasst. [10-12, 14] Die Relevanz des T1D nimmt also stetig zu, was eine intensive Auseinandersetzung mit seiner Pathogenese, Prävention und Therapie erforderlich macht.

1.1.2 Unterschiede in Europa und Subsahara-Afrika

Die meisten Erkenntnisse über den Typ-1-Diabetes beruhen auf Studien aus westlichen Ländern, die mit dort lebenden ProbandInnen durchgeführt wurden. Demgegenüber liegen aus klinischen oder epidemiologischen Studien zu T1D in Ländern mit limitierten Ressourcen bislang nur begrenzte Daten vor. [15-17] Jedoch konnte bereits herausgestellt werden, dass T1D bei Personen diverser Herkunftsländer auftritt. [1, 2, 18, 19] In verschiedenen Regionen der Welt sind dabei unterschiedliche Inzidenzen zu verzeichnen. [4, 10, 12] Karvonen et al. beschrieben zudem eine positive Korrelation der Inzidenz mit der Entfernung vom Äquator in Richtung Norden, entsprechend eines Nord-Süd-Gefälles. [4] Auch in Subsahara-Afrika ist T1D eine bedeutende Erkrankung, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. [16, 20-22]

Ein wesentlicher Unterschied zwischen PatientInnen aus Subsahara-Afrika und PatientInnen aus westlichen Ländern ist das Erkrankungsalter. Während in westlichen Ländern zwei Erkrankungsgipfel zu beobachten sind, wobei der erste zwischen fünf und

neun Jahren und der zweite zwischen zehn und vierzehn Jahren liegt, [2, 12, 14, 23] wird in Subsahara-Afrika ein deutlich späteres Manifestationsalter beschrieben, welches bei durchschnittlich 17 bis 22 Jahren liegt. [21, 24-26] Demnach ist die Inzidenz im Kindesalter dort vergleichsweise gering. [26-28] Alemu et al. beschreiben im Rahmen einer Studie in Äthiopien eine höhere Inzidenz in urbanen als in ländlichen Regionen. [27] Außerdem beobachteten Hussien et al. einen Zusammenhang zwischen dem Lebensstil und dem T1D-Erkrankungsmuster. Ein eher westlicher Lebensstil war dabei mit einem eher westlichen Erkrankungsmuster und somit einer früheren Manifestation assoziiert. [29] Auch frühe Mangelernährung wurde bereits mit der Entstehung eines T1D in Verbindung gebracht. [15] Ein weiterer erkrankungsbezogener Unterschied zwischen Ländern in Subsahara-Afrika und westlichen Ländern liegt in der Geschlechterverteilung. In vorausgegangen Studien konnte dabei eine höhere Anzahl männlicher Patienten im Verhältnis zu weiblichen Patientinnen in Europa erfasst werden. [9, 23, 24, 30-32] Im Gegensatz dazu wurde durch eine Studie von Seyfarth et al. eine höhere Anzahl weiblicher Patientinnen im Vergleich zu männlichen Patienten in Kumasi, Ghana beschrieben. [24] Auch Kalk et al. beobachteten eine höhere Anzahl weiblicher Patientinnen in Südafrika. [26] Wodurch die globalen Unterschiede innerhalb des T1D genau hervorgerufen werden, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.2 Pathogenese des T1D

1.2.1 Einführung in die T1D-Pathogenese

T1D ist eine progressive Autoimmunerkrankung, die durch die Zerstörung von Insulin-sezernierenden β -Zellen des Pankreas durch autoreaktive T-Zellen hervorgerufen wird. [33-38] In *Non-obese diabetes* (NOD) Maus-Experimenten konnte gezeigt werden, dass es kompensatorisch zunächst zu einer vermehrten Proliferation und Insulinproduktion der verbleibenden β -Zellen kommt, die der Zellzerstörung jedoch nicht langfristig entgegenwirken können, wodurch eine langsame Abnahme der β -Zell-Masse über die Zeit erfolgt. [39, 40] Erst ab einer Reduktion der β -Zellmasse von circa 80 bis 90% kommt es zur klinischen Manifestation des T1D, mit hyperglykämischen Zuständen und den Hauptsymptomen Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust. [41, 42]

Neben autoimmunen Prozessen wurden in der komplexen Pathogenese des T1D auch klinische Einflussfaktoren, wie zum Beispiel der BMI (*body mass index*), als ätiologisch

relevant beschrieben. [43, 44] Außerdem wird vermutet, dass die Ernährung sowohl eine Rolle in der Entstehung als auch dem Voranschreiten des T1D spielt. [45-48]

1.2.2 T-Zellen in der T1D-Pathogenese

In der T1D-Pathogenese geht man von einem Missverhältnis von proinflammatorischen Effektor-T-Zellen (Teff) und antiinflammatorischen regulatorischen T-Zellen (Treg) aus. [49-51] Regulatorische T-Zellen wandern nach ihrer Entwicklung im Thymus in die Peripherie aus und sind grundsätzlich in der Lage, Teffs zu supprimieren. Dadurch haben sie eine wesentliche Funktion im immunologischen Gleichgewicht, in der Erhaltung von Selbsttoleranz und der Prävention von Autoimmunerkrankungen. [52-55] In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass eine verminderte Anzahl an Tregs mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen korreliert. [52, 56, 57] In der T1D-Pathogenese stehen zudem dysfunktionale Tregs im Vordergrund. [58-62] So zeigten Tregs von T1D-PatientInnen zum Beispiel eine reduzierte Fähigkeit zur Suppression von Teffs im Vergleich zu Tregs von Gesunden. [50, 58, 61, 62] Jailwala et al. beobachteten außerdem höhere Apoptose-Raten von Tregs in T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollgruppen sowie höhere Apoptose-Raten von Tregs im Vergleich zu Teffs in T1D-PatientInnen. [50] Dysfunktionale Tregs und resistente Teffs tragen somit zu einem Ungleichgewicht zwischen Regulator- und Effektor-Aktivität bei. [58, 59, 61, 63]

Effektor-T-Zellen haben zentrale Funktionen in der Modulation von Immunantworten und dem Schutz vor Pathogenen. [64] Autoreaktive Effektor-T-Zellen hingegen, die die Selektionsmechanismen im Thymus überlebt haben, verfügen über eine veränderte Effektorfunktion, die Schäden am körpereigenen Gewebe verursachen und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen kann. [65-67] In der T1D-Pathogenese kommt es zunächst zu einem Anstieg jener autoreaktiver Teffs, der von einer parallelen Expansion regulatorischer T-Zellen begleitet wird. Im weiteren Verlauf reicht die Kapazität der Tregs nicht mehr aus, die Aktivität der autoreaktiven Zellen zu regulieren, sodass die β -Zellzerstörung zunimmt und die Inselzellfunktion des Pankreas abnimmt. [68, 69]

1.2.3 Klassifizierung naiver und Gedächtnis-T-Zellen

T-Zellen können anhand ihrer Oberflächenmarker in naive und Gedächtnis-T-Zellen unterteilt werden. Für die Klassifizierung dieser *Memory Subsets* können die Marker CD45RA (*Cluster of differentiation 45RA*) und CCR7 (*Chemokine receptor 7*) verwendet werden. [70, 71] Anhand der Expression dieser Marker lassen sich vier Gruppen voneinander unterscheiden: CD45RA+/CCR7+ Naive-T-Zellen (T_N), CD45RA-/CCR7+ Zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}), CD45RA+/CCR7- Effektor-Gedächtniszellen, die CD45RA re-exprimieren (T_{EMRA}) sowie CD45RA-/CCR7- Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}). [70, 72-74]

CD45RA ist dabei ein wichtiger Marker für T_N , die noch keinen Antigenkontakt hatten. Hat ein Antigenkontakt stattgefunden, entwickeln sich die T_N zu Effektor- und Gedächtniszellen weiter. Bereits differenzierte T-Zellen, die CD45RA re-exprimieren, kennzeichnen T_{EMRA} . [70, 72, 75, 76] CCR7 ermöglicht die Wanderung von T_N sowie von antigenpräsentierenden Zellen (APC) in die Lymphknoten, welche dort über Antigenkontakt aktiviert und zur Proliferation angeregt werden können. Währenddessen erfolgen die Differenzierung sowie der Erwerb von Effektor- und Gedächtnisphänotypen. Dabei wird CCR7 wieder herunterreguliert. [70, 77-81]

1.2.4 Funktion naiver und Gedächtnis-T-Zellen

Im Rahmen des Reifungsprozesses und des Erwerbs von Effektorfunktionen verlieren T-Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung. T_N haben dabei das größte Teilungs- und Selbsterhaltungspotenzial, gefolgt von T_{CM} , T_{EM} und zuletzt T_{EMRA} . Den höchsten Differenzierungsgrad hingegen zeigen T_{EMRA} , gefolgt von T_{EM} , T_{CM} und zuletzt T_N . [82-86]

T_N (CD45RA+/CCR7+) sind die T-Zellen, die noch nicht mit Antigenen in Kontakt gekommen sind, ein ausgeprägtes Potenzial zur Proliferation und Selbsterneuerung haben und in Effektor- und Gedächtniszellen differenzieren können. [70, 84, 85, 87] T_{CM} (CD45RA-/CCR7+) sind langlebige Gedächtniszellen, die sich selbst erneuern und durch Antigen-Stimulation kurzlebigere T_{EM} generieren können. Sie sind demnach weniger differenziert als T_{EM} und stellen eine funktionelle Zwischenstufe von T_N und T_{EM} dar. T_{CM} produzieren hauptsächlich IL-2 und können hiervon mehr produzieren als T_{EM} . [70, 75, 82, 83, 88, 89] Zhang et al. beschrieben zudem, dass T_{CM} in funktionelle regulatorische T-Zellen differenzieren können, die in der Lage sind, die Proliferation von

Effektor-T-Zellen zu unterdrücken. [90] T_{EM} (CD45RA-/CCR7-) haben eine kürzere Überlebensdauer und ein geringeres proliferatives Potenzial als T_{CM}. Sie verfügen über eine stärkere Abwehr- und Effektorfunktion als T_{CM} und verlieren ihre Fähigkeit, zu proliferieren und IL-2 zu produzieren. [70, 72, 82, 83, 85] T_{EMRA} (CD45RA+/CCR7-) zeigen ähnliche Eigenschaften wie T_{EM} und haben eine stark proinflammatorische Wirkung, welche auch ohne Antigenstimulus in Kraft treten kann. [75, 91] In vorausgegangenen Studien wurde bereits beschrieben, dass autoreaktive Effektor- und Gedächtniszellen eine Rolle in der Entstehung autoimmuner Erkrankungen spielen. [86, 92-94]

1.3 Einführung des Interleukin-2-Rezeptors

1.3.1 Aufbau und Vorkommen

Der Interleukin-2- (IL-2) Rezeptor (Abb. 1) besteht aus einer α -Kette „CD25“ (*Cluster of differentiation 25*), einer β -Kette „CD122“ (*Cluster of differentiation 122*) und aus einer *common cytokine receptor* γ -Kette „CD132“ (*Cluster of differentiation 132*) zur Bindung des Zytokins IL-2. Zellen können dabei entweder einen dimeren Rezeptor, bestehend aus β - und γ -Kette exprimieren, der eine intermediäre Affinität zu IL-2 aufweist, oder einen trimeren Rezeptor, bestehend aus α -, β - und γ -Kette, welcher als hochaffin gegenüber IL-2 gilt. [95-101]

In vorausgegangenen Studien wurde beschrieben, dass der hochaffine IL-2-Rezeptor nur auf Tregs konstitutiv exprimiert wird und somit eine Besonderheit dieser regulatorischen T-Zellen ist. [55, 56, 96, 102] Die β - und *common* γ -Ketten hingegen werden auch von anderen Zell-Gruppen und innerhalb anderer Rezeptoren exprimiert. [96, 99, 100] Weitere Studien zeigten, dass CD25 nicht nur als Marker regulatorischer T-Zellen, sondern auch als Aktivierungsmarker konventioneller T-Zellen fungiert. [103, 104] Dies bedeutet, dass CD25 einerseits charakteristisch für Tregs ist, jedoch andererseits auch von konventionellen T-Zellen nach Aktivierung exprimiert werden kann. Eine Analyse der IL-2-Struktur lässt vermuten, dass die IL-2-Rezeptor- α -Kette so mit der *common* γ -Kette interagieren kann, dass eine Komplexbildung von Rezeptoren und dadurch eine erhöhte Sensitivität gegenüber IL-2 ermöglicht wird. [95]

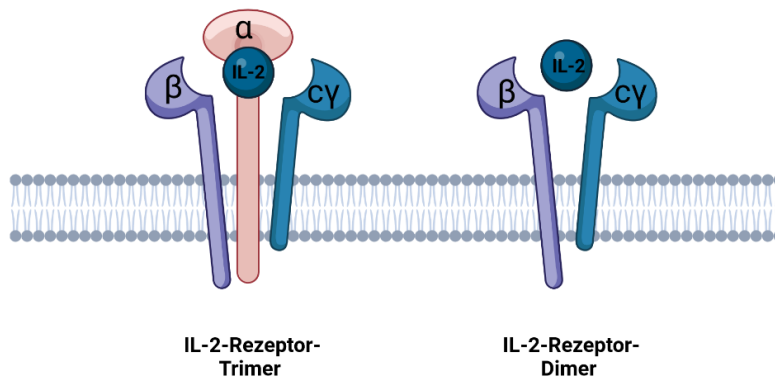


Abb. 1 - Struktur des IL-2-Rezeptors in hochaffiner (Trimer) und mäßig affiner (Dimer) Variante.

Der IL-2-Rezeptor besteht in seiner hochaffinen Variante aus einer α -, β - und *common* γ -Kette und in seiner mäßig affinen Variante nur aus einer β - und *common* γ -Kette. Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

1.3.2 Funktion und Rolle im T1D

IL-2 ist wichtig für die Proliferation von T-Zellen [105] sowie für die Entwicklung von Tregs im Thymus, ihre Erhaltung, Funktion und Stabilisierung. [51, 102, 106-108] Die T-Zell-Sensitivität für IL-2 ist dabei abhängig von der Expression des IL-2-Rezeptors. [95, 99] Regulatorische T-Zellen sezernieren IL-2 jedoch nicht selbst und sind daher auf die IL-2-Produktion anderer Zellen angewiesen. [107, 109, 110] IL-2 kann dann über die Interaktion mit dem IL-2-Rezeptor zur Aktivierung von Tregs führen und periphere Immuntoleranz sowie die Erhaltung von Selbsttoleranz gewährleisten. [54, 55, 110, 111] Somit können IL-2 sowie der IL-2-Rezeptor über die Stimulation und Expansion von Tregs eine Überaktivierung des Immunsystems und folglich Autoimmunität verhindern. [54, 56, 112, 113]

Eine hohe CD25-Expression auf Tregs ist dabei entscheidend für eine starke Immunantwort auf IL-2 Stimulation und essentiell für die Erhaltung ihrer regulatorischen Funktion sowie für die Suppression autoreaktiver T-Zellen, die die negative Selektion im Thymus überlebt haben. [113, 114]

Im Rahmen vorheriger Studien konnte die zentrale Rolle von IL-2 und dem IL-2-Rezeptor- α in der Entwicklung von Autoimmunität gezeigt werden. [102, 112, 115, 116] In Mausexperimenten führte der Einsatz von Anti-IL-2-Antikörpern über eine Reduktion von Tregs zu unkontrollierter T-Zell-Proliferation und Autoimmunität. [102, 112, 116] Zudem konnte in *knock-out* Mäusen mit Defekten in IL-2 oder dem IL-2-Rezeptor ein frühzeitiger Tod als Folge von autoimmunem Prozessen beschrieben werden. [115, 116]

Auch in Menschen können Defekte im IL-2-Rezeptor- α , sowie eine verminderte / dysfunktionale Aktivität von Tregs zu Autoimmunität führen. [52, 117, 118] Außerdem wurde im Rahmen vorausgegangener Studien eine verminderte IL-2-Produktion, Treg-Dysfunktion und ein reduziertes IL-2-*Signaling* in T1D-PatientInnen gezeigt. Dies unterstreicht die zentrale Rolle von IL-2-Rezeptordefekten sowie Defekten im entsprechenden Signalweg für die Pathogenese des T1D. [58-61]

Da IL-2 besonders in niedriger Konzentration zu Proliferation von T-Zellen – vor allem von Tregs – führt, [119] wird in aktuellen Studien der Einsatz von niedrig dosiertem IL-2 als potenzielle Therapie von Autoimmunerkrankungen untersucht. Dabei konnte neben dem Anstieg von Tregs [120, 121] bei T1D-PatientInnen auch eine Veränderung des Verhältnisses von Tregs zu Teffs zu Gunsten der Tregs beobachtet werden. [122] In weiteren Studien zu niedrigdosiertem IL-2 in der Therapie autoimmuner Erkrankungen wurden zudem eine Verbesserung der Symptomatik sowie eine Verlangsamung der Krankheitsprogression beschrieben. [123, 124]

1.4 Einführung des Interleukin-7-Rezeptors

1.4.1 Aufbau und Vorkommen

Der Interleukin-7- (IL-7) Rezeptor (Abb. 2) ist ein Heterodimer, bestehend aus zwei Polypeptiden: der IL-7-Rezeptor α -Kette „CD127“ (*Cluster of differentiation* 127) und der *common* γ -Kette „CD132“ (*Cluster of differentiation* 132), welche zudem einen Teil des IL-2-, IL-4-, IL-9-, IL-15- und IL-21-Rezeptors darstellt. [125-130] Er wird auf naiven T-Zellen, einem Teil der Gedächtnis-T-Zellen sowie auf Prä-B-Zellen, Monozyten und lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert und ist wesentlich für ihre Erhaltung und Funktion. [131-133]

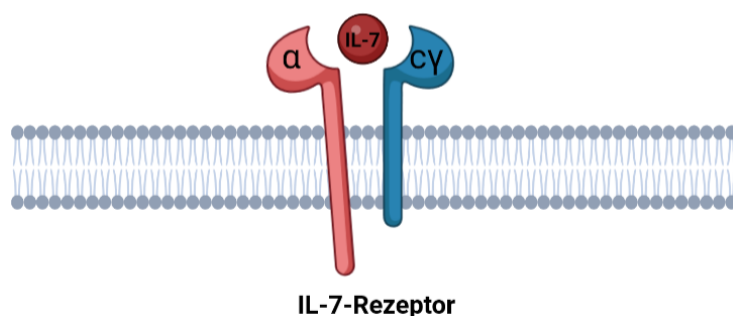


Abb. 2 - Struktur des IL-7-Rezeptors.

Der IL-7-Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus α -, und *common* γ - ($c\gamma$) Kette. Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt.

1.4.2 Funktion und Rolle im T1D

IL-7 spielt eine wesentliche Rolle im Wachstum von Prä-B- und Prä-T-Zellen. Die Sensitivität für IL-7 ist dabei von der Expression des IL-7-Rezeptors abhängig. [131, 133, 134]

Der IL-7-Rezeptor- α sowie der bei Aktivierung folgende Signalweg sind wichtig für die T-Zell-Erhaltung, -Proliferation, -Differenzierung und die Ausbildung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. [131, 132, 134, 135] In T-Zellen ist die IL-7-Rezeptor- α -Kette stark reguliert, um eine Dysfunktion des Immunsystems zu verhindern. [136, 137] IL-7 sowie der IL-7-Rezeptor sind außerdem relevant für die Entstehung autoimmuner und lymphoproliferativer Erkrankungen. [137-140] Dabei hat IL-7 als Wachstumsfaktor eine besondere Relevanz in der Entwicklung autoreaktiver Effektor-T-Zellen und Förderung von Effektor-Aktivität. [141-143] Pellegrini et al. zeigten zudem, dass IL-7 einen inhibitorischen Effekt auf Tregs hat, sodass das Gleichgewicht von regulatorischen und Effektor-T-Zellen, im Hinblick auf die Förderung von Autoimmunität, beeinflusst wird. [51, 142] Seyfarth et al. beschrieben zudem eine höhere IL-7-Sensitivität auf CD4+ (*Cluster of differentiation* 4) T-Zellen von T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollgruppen. Zudem wurde eine höhere Expression der IL-7-Rezeptor- α -Kette auf CD4+ T-Zellen von Kindern mit T1D im Vergleich zu gesunden Kindern beschrieben. [144, 145] Des Weiteren bewirkte eine Blockade der IL-7-Rezeptor- α -Kette in NOD-Tiermodellen eine Prävention und Revision von Diabetes-Neumanifestationen. [146] Derzeit wird zudem der Einsatz von Anti-IL-7-Rezeptor-Antikörpern zur Therapie autoimmuner Erkrankungen erprobt. [147, 148]

1.5 Bedeutung der IL-2- und IL-7-Rezeptor-Expression in der T1D-Pathogenese

Ein wesentliche Rolle in der T1D-Pathogenese spielt das Missverhältnis von Effektor- und regulatorischen T-Zellen, [49-51] die durch ihre spezifische IL-2-Rezeptor- und IL-7-Rezeptor-Expression charakterisiert werden. [56, 131] IL-2 fördert dabei die Treg-Entwicklung und Funktion, während IL-7 wesentlich für die Entwicklung autoreaktiver Effektor-T-Zellen ist. [102, 107, 142, 143] IL-2-Rezeptor- α (CD25) und IL-7-Rezeptor- α (CD127) doppelpositive T-Zellen exprimieren also Rezeptoren, die entgegengesetzte Prozesse fördern und deren Relevanz für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bekannt ist. [102, 112, 115, 137, 138] Die IL-2-Rezeptor- α - und die IL-7-Rezeptor- α -

Kette sind daher während der T-Zell-Aktivierung und Reifung stark reguliert. [134, 136] In vorausgegangenen Studien wurde vermutet, dass doppelpositive T-Zellen zur Kontrolle und Reduktion von Inflammation beitragen und in T1D-PatientInnen proinflammatorische Immunantworten in antiinflammatorische Immunantworten umwandeln können. [149, 150] Narsale et al. beschrieben, dass eine erhöhte Frequenz doppelpositiver CD4⁺ T-Zellen bei Kindern mit T1D mit einer verzögerten Krankheitsprogression assoziiert ist. Ein höherer Anteil dieser bei Manifestation korrelierte mit einem langsameren Verlust der β -Zellfunktion und einer längeren partiellen Remissionsphase. [150, 151] Diese Beobachtungen deuten auf eine potenziell protektive, antiinflammatorische Funktion der doppelpositiven T-Zellen hin. Ob diese jedoch auch bei Langzeit-T1D-PatientInnen eine Rolle spielen und ob sie mit einem unterschiedlichen klinischen Verlauf assoziiert sind, ist bislang nicht geklärt. Diese Beobachtungen unterstreichen die Relevanz der doppelpositiven T-Zellen als Ziel weiterer immunologischer Forschung.

1.6 Ziele der Arbeit

Typ-1-Diabetes ist durch die steigende Inzidenz eine Erkrankung mit weltweit zunehmender Relevanz. Dass die Expression des IL-2- und IL-7-Rezeptors eine Rolle in der Entstehung autoimmuner Erkrankungen spielt, ist bereits bekannt. Zudem konnte der Anteil doppelpositiver CD4⁺ T-Zellen zum Manifestationszeitpunkt mit dem Erhalt der β -Zell-Funktion sowie einer längeren partiellen Remissionsphase in T1D-PatientInnen in Zusammenhang gebracht werden. Ob die doppelpositiven CD4⁺ T-Zellen auch eine Rolle bei Langzeit-T1D-PatientInnen spielen und mit einem unterschiedlichen klinischen Verlauf des Diabetes assoziiert sind, ist bislang unbekannt. Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit, die IL-2-Rezeptor- und IL-7-Rezeptor-Expression auf CD4⁺ T-Zellen von T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen zu charakterisieren. Des Weiteren sollten die Ergebnisse der Immunphänotypisierung mit klinischen Parametern der ProbandInnen assoziiert werden. Dies sollte anhand von zwei voneinander unabhängigen Studienkollektiven im Rahmen der STOP-T1D-Studie erfolgen, welche als Querschnitts-Kohortenstudie parallel in Kumasi, Ghana und Düsseldorf durchgeführt wird und sich mit der Identifikation von immunologischen, genetischen und umweltassoziierten Faktoren sowie deren Einfluss auf die T1D-Pathogenese beschäftigt. Abschließend sollte ein Vergleich der Ergebnisse beider Kohorten im Hinblick auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Ausstattung

Tabelle 1 - Laborgeräte/Ausstattung

Laborgerät/Ausstattung	Hersteller
Durchflusszytometer LSRFortessa™	BD, Heidelberg
ErgoOne® Mehrkanalpipetten (0,5-10µl; 30-300µl)	Starlab, Hamburg
ErgoOne® Pipetten (0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 2-20µl; 20-200µl; 100-1000µl)	Starlab, Hamburg
Finnpipette F1 Mehrkanalpipette (5-50µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Flüssigstickstofftank Biosafe MD (Weithals)	Manitowoc Ice, Wisconsin
Kühlschrank 4°C (Comfort No Frost / Premium)	Liebherr, Bulle
Mikroskop CK40	OLYMPUS, Hamburg
Mr. Frosty Kryo-Einfriercontainer	Nalgene, Langenselbold
Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025mm ²)	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Pipettierhilfe PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences, Fernwald
Research® Pipetten (0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank Thermo Heraeus Hera Safe HS18	Heraeus, Hanau
Ultratiefkühlschrank -86°C (TSX50086V)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Zentrifuge Eppendorf 5805R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Mülheim an der Ruhr

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 - Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf Mikrozentrifugen-Röhrchen (0,5ml, 1ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen (5ml Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
FALCON™-Röhrchen (15ml, 50ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Handschuhe, Nitril Micro-Touch®	Ansell, München
Kryoröhrchen (1,8ml)	Thermo Fischer Scientific, Waltham
Pipettenspitzen, steril (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Starlab, Hamburg
Reservoirs steril/unsteril	Starlab, Hamburg
Rotilabo Serologische Pipetten / Stripetten, steril (5ml, 10ml, 25ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten Corning® Costar® Stripetten®	Corning Inc., New York
Vacutainer® Lithium-Heparin-Röhrchen (6ml)	BD, Heidelberg
Vacutainer® Safety-Lok™ (0,8mm, 0,6mm)	BD, Heidelberg
Zellkulturplatten, Rundboden (96-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3 - Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ampuwa® Aqua dest. Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacillol® AF Flächendesinfektion	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
FACS Flow™ <i>Clean Solution</i>	BD Biosciences, San José
FACS Flow™ <i>Rinse Solution</i>	BD Biosciences, San José
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Histopaque®-1077 Hybri Max (Ficoll)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kodan® Tinktur forte	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Trypanblau 0,4% Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Viabilitätsfarbstoff eFluor® 780	Thermo Fisher Scientific, Waltham

2.1.4 Medien

Tabelle 4 - Medien

Medium	Bestandteile	Konzentration	Hersteller
Gefrierlösung	DMSO	10%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	FKS	90%	Thermo Fisher Scientific, Waltham

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5 - Antikörper für ex-vivo Färbung

Antikörper	Markierung	Klon	Hersteller
Anti-CD3	AF700	SK7	BioLegend, Fell
Anti-CD4	BV510	OKT4	BioLegend, Fell
Anti-CD5	BV605	L17F2	BioLegend, Fell
Anti-CD8a	FITC	HIT8a	BioLegend, Fell
Anti-CD25	BV421	BC96	BioLegend, Fell
Anti-CD27	PerCP-Cy5.5	M-T271	BioLegend, Fell
Anti-CD45RA	APC	HI100	BioLegend, Fell
Anti-CD95	BV650	DX2	BioLegend, Fell
Anti-CD127	PE-Cy7	A019D5	BioLegend, Fell
Anti-CD197	PE	G043H7	BioLegend, Fell

2.1.6 Software

Tabelle 6 - Software

Software	Hersteller
CGM MEDICO KIS	CompuGroup Medical Deutschland AG, Koblenz
EndNote v20	Adept Scientific, Frankfurt
FACSDiva™ v6.0	BD, Heidelberg
FlowJo™ v10.8.1	BD Biosciences, San José
Graphpad Prism v8.0	GraphPad Software Inc., San Diego
Microsoft Excel/PowerPoint/Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond

2.1.7 Spenderzellen

Die Experimente wurden mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC) durchgeführt, die aus Vollblut von Typ-1-Diabetes- (T1D) PatientInnen und gesunden SpenderInnen gewonnen wurden. Dieses lag als heparinisiertes Vollblut von PatientInnen aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf, dem Deutschen Diabeteszentrum (DDZ) in Düsseldorf sowie von MitarbeiterInnen der Kinderklinik vor. Auch im Labor unserer KooperationspartnerInnen im *Kumasi Centre for Collaborative Research* (KCCR) wurde heparinisiertes Vollblut von DiabetespatientInnen und gesunden SpenderInnen aus dem *Komfo Anokye Teaching Hospital* (KATH) in Kumasi, Ghana verwendet. Die Blutspende erfolgte ausschließlich nach ausführlicher schriftlicher Aufklärung. Die erhaltenen Proben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Ankunft im Labor weiterverarbeitet.

2.2 Methoden

2.2.1 ProbandInnenrekrutierung

Die Rekrutierung der StudienteilnehmerInnen erfolgte im Rahmen der STOP-T1D-Studie, einer Querschnitts-Kohortenstudie unserer Arbeitsgruppen, an der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf, woran ich beteiligt war, dem DDZ in Düsseldorf, vor allem durch Herrn Maximilian Huttasch sowie dem KATH in Kumasi, durch MitarbeiterInnen des Teams vor Ort. Dabei wurden T1D-PatientInnen im Kindes- und Erwachsenenalter sowie gesunde ProbandInnen im gleichen Alter rekrutiert. Die Kriterien für die Auswahl gesunder ProbandInnen waren das Fehlen von Autoimmun-, Tumor- und akuten oder chronischen Infektionserkrankungen. Nach ausführlicher schriftlicher Aufklärung der ProbandInnen sowie der Erziehungsberechtigten wurde die Einwilligung zur Teilnahme in Form einer Unterschrift bestätigt. Dabei war in einem Alter von unter 14 Jahren die Unterschrift der Erziehungsberechtigten ausreichend, wohingegen bei Kindern über 14 Jahren eine Unterschrift der Erziehungsberechtigten sowie der ProbandInnen eingeholt wurde. Erst nach schriftlicher Einwilligung erfolgte die sterile Blutentnahme. Für diese Arbeit wurden je ProbandIn circa zehn Milliliter heparinisiertes Vollblut entnommen, welches anschließend zur Weiterverarbeitung in das zuständige Labor gebracht wurde.

2.2.2 PBMC-Isolation

Die im Folgenden beschriebenen Experimente erfolgten nach bereits etablierten Protokollen und wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um zunächst periphere mononukleäre Zellen (PMBC) aus heparinisiertem Vollblut zu isolieren, wurde eine Dichtezentrifugation angewendet. Dabei wurde das Blutvolumen (ca. 10ml) mit der gleichen Menge *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (D-PBS) verdünnt. Anschließend wurden 15ml Ficoll (Histopaque®-1007) vorsichtig in ein 50ml-FALCON™-Röhrchen gegeben, auf das das verdünnte Blut langsam aufgetragen wurde, um eine Vermischung der Schichten zu vermeiden. Anschließend erfolgte die erste Zentrifugation für 30 Minuten bei 1500 *rotations per minute* (rpm), Raumtemperatur (RT) sowie bei minimaler Akzeleration und Dezeleration, sodass die PBMCs zwischen Plasma und Ficoll als klar abgrenzbarer Ring sichtbar wurden. Diese Schicht wurde dann vorsichtig mit einer Stripette entnommen, zu 10ml kaltem D-PBS (4°C) pipettiert und für die weiteren Schritte auf Eis gehalten. Die PBMC-PBS-Flüssigkeit wurde dann unter Zugabe von kaltem PBS auf eine Gesamtmenge von 50ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte dabei für 20 Minuten bei 1200 rpm, einer Temperatur von 4°C sowie bei maximaler Akzeleration und Dezeleration. Nach Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und die PBMCs in 1ml D-PBS resuspendiert. Anschließend wurden die gelösten PCMCs mit kaltem PBS auf ein Gesamtvolumen von 10ml gebracht und für 12 Minuten bei 1200 rpm, 4°C und maximaler Akzeleration und Dezeleration zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand dekantiert und das entstandene Pellet in 2-3ml D-PBS, abhängig von der Menge des Blutes beziehungsweise der Größe des Pellets, resuspendiert.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurden die PBMCs mit einer Trypanblau-Lösung (1:10 Trypanblau in D-PBS) im Verhältnis von 1:40 gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Vitale Zellen mit intakter Zellwand blieben dadurch farblos, während avitale Zellen den Farbstoff aufnahmen und blau gefärbt erschienen. Nach mehrfachem Resuspendieren der PBMCs in der Trypanblau-Lösung wurden 10µl auf die vorbereitete Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop in allen vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend auf das Volumen hochgerechnet, um die Zellkonzentration in Zellen pro Milliliter zu berechnen.

2.2.4 Kryokonservierung

Nicht unmittelbar benötigte Zellen wurden für spätere Analysen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen nach der Zellzahlbestimmung 5 Minuten bei 1500 rpm, 4°C sowie maximaler Akzeleration und Dezeleration zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in einer vorbereiteten Kryolösung resuspendiert. Diese wurde zuvor aus 90% Fetalem Kälberserum (FKS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) vorbereitet. DMSO hat dabei die Funktion, eine Kristallbildung in den Zellen und um die Zellen herum zu verhindern. Somit kann ein vermehrtes Absterben der Zellen während des Gefrierens verhindert werden. Je Kryo-Röhrchen wurden 1ml Lösung hergestellt und $5-7 \times 10^6$ Zellen eingefroren. Die Röhrchen wurden dann umgehend in einen Kryo-Einfrierkontainer transferiert und in einem -80°C kalten Gefrierschank aufbewahrt. Nach 24-72 Stunden wurden sie schließlich in einen -150°C kalten Stickstoffbehälter transferiert.

2.2.5 Antikörperfärbung

Die Färbung der Spenderzellen mit spezifischen fluoreszenz-markierten Antikörpern (AK) dient der Darstellung von Oberflächenmarkern und somit der Immunphänotypisierung. Für die Antikörperfärbung wurde ein *Mastermix* aus fluoreszenzmarkierten Antikörpern in PBS vorbereitet. Je Probe wurden 2x 5µl (5µl pro Duplikat) benötigt, sodass die Menge der vorbereiteten *Mastermix*-Lösung der Probenanzahl entsprach. Die Zusammensetzung der 5µl *Mastermix* ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen. (Tabelle 7)

Tabelle 7 - *Mastermix* für die Färbung der PBMCs

Oberflächenmarker	Markierung	Menge / Well
CD3	AF700	0,2µl
CD4	BV510	0,5µl
CD5	BV605	0,2µl
CD8a	FITC	0,2µl
CD25	BV421	0,2µl

Oberflächenmarker	Markierung	Menge / <i>Well</i>
CD27	PerCP-Cy5.5	0,2µl
CD45RA	APC	0,05µl
CD57	PE-Dazzle 594	0,005µl
CD95	BV650	0,1µl
CD127	PE-Cy7	0,2µl
CD197 (CCR7)	PE	0,1µl
PBS		3,045µl

Von den zuvor isolierten PBMCs wurden je StudienteilnehmerIn zwei Duplikate mit 2×10^5 Zellen angefärbt. Dabei wurden die Zellen zunächst in zwei *Wells* einer 96-*Well* Rundbodenplatte gesät. Diese wurde anschließend für 5 Minuten bei 1500 rpm, 4°C sowie bei maximaler Akzeleration und Dezeleration zentrifugiert. Parallel erfolgte die Vorbereitung des Viabilitätsfarbstoffes. Dazu wurde der Via-Farbstoff eFluor 780 (1:100) genutzt und durch Zugabe von kaltem D-PBS eine Verdünnung von 1:1000 hergestellt. Mit der Viabilitätsfärbung wurden avitale Zellen gekennzeichnet, sodass sie bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse von vitalen Zellen unterschieden und nicht in die Auswertung einbezogen wurden. Der Überstand in der zentrifugierten Platte wurde im folgenden Schritt mittels Mehrkanalpipette entfernt. Bei RT wurden dann 5µl Via-PBS-Lösung pro *Well* pipettiert und unter Schaumbildung mittels Mehrkanalpipette mit den vorhandenen Zellen resuspendiert, um eine gleichmäßige Färbung zu erhalten. Anschließend wurde die Platte für 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation folgte die erste Waschung, bei der mit einer Mehrkanalpipette 180µl D-PBS pro *Well* hinzugegeben wurden und eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm, 4°C sowie bei maximaler Akzeleration und Dezeleration durchgeführt wurde. Die weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde erneut entfernt, 5µl des vorbereiteten *Mastermix* pro *Well* hinzugegeben und unter Schaumbildung gut mit den vorhandenen Zellen resuspendiert. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Für die folgende Waschung wurden nochmals 180µl D-PBS pro *Well* hinzugegeben und die Platte für 5 Minuten bei 1500 rpm, 4°C sowie bei maximaler

Akzeleration und Dezeleration zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend nochmals entfernt, 180µl D-PBS pro *Well* hinzugegeben und die Platte für 5 Minuten bei 1500 rpm, 4°C sowie bei maximaler Akzeleration und Dezeleration zentrifugiert. Danach wurde der Überstand ein letztes Mal abgenommen und pro *Well* 100µl D-PBS hinzugegeben. Die gefärbten und in D-PBS gelösten Zellen wurden schließlich in FACS-Röhrchen transferiert und mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.6 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung

Die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode, die zur Analyse von Zellsuspensionen eingesetzt wird. Dabei saugt das Durchflusszytometer die Zellen an und steuert ihren Fluss so, dass sie nacheinander durch das Durchflusszytometer fließen und einzeln mit Lasern bestrahlt werden können. Die entstehenden Lichtsignale werden mithilfe von Detektoren, Messsystem und Amplifikationssystem innerhalb kurzer Zeit in Informationen umgewandelt, die dann an einen Computer zur Analyse und Charakterisierung der Zellen weitergegeben werden. Dabei kann über das sogenannte Vorwärtsstreulicht „*forward scatter*“ (FSC), welches abhängig von dem Volumen der Zelle durch eine flache Brechung des Lichtes entsteht, die Größe der Zelle bestimmt werden. Zudem wird die rechtwinklige Streuung des Lichts gemessen, die abhängig von der Granularität der Zellen und der Größe des Zellkerns ist. Durch dieses sogenannte Seitwärtsstreulicht „*sideward scatter*“ (SSC) wird somit die Beschaffenheit der Zelle bestimmt. Ist eine vorherige Inkubation der Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgt, kann zudem eine Analyse der Oberflächenmarker stattfinden. Dabei regen die vorhandenen Laser Fluoreszenz-markierte Bestandteile an. Die emittierten Wellenlängen der Lichtsignale werden mittels Detektoren erfasst und an den Computer weitergeleitet. Dabei kann zeitgleich die Expression verschiedener Moleküle auf der Zelloberfläche gemessen werden. Zur Immunphänotypisierung der Zellen wurden die oben gelisteten, fluoreszenz-markierten Antikörper eingesetzt. Für die Durchflusszytometrie wurde der LSR FortessaTM unter Verwendung der Software FACSDiva v6.0 genutzt. Die beschriebenen Experimente wurden für die deutsche Kohorte größtenteils von mir durchgeführt. Ergänzende Daten stammen von weiteren Gruppenmitgliedern der Arbeitsgruppe Jacobsen. Für die ghanaische Kohorte wurden die Experimente durch das Team des KCCR in Kumasi durchgeführt. Die Datenverarbeitung erfolgte anschließend durch mich.

2.2.7 Auswertung der Oberflächenmarker

Für die Auswertung der Oberflächenmarker, die mittels der Software FlowJo™ v10.8.1 erfolgte, wurden einzelne Zellpopulationen durch ein einheitliches *Gating* (Abgrenzung einzelner Gruppen) bestimmt. (Abb. 3-4) Dabei wurden die Zellen zunächst in ihrer Höhe (FSC-H) gegen ihre Fläche (FSC-A) dargestellt, um Einzelzellen (*Singlets*) zu markieren und von aneinanderhaftenden Zellen zu unterscheiden. Danach wurden die *Singlets* im *Forward Scatter* (FSC) gegen den *Sideward Scatter* (SSC) sortiert, um auf Lymphozyten zu *gaten* und Monozyten auszugrenzen. Anders als in der deutschen Kohorte, sind in der ghanaischen Kohorte Lymphozyten in dieser Darstellung optisch deutlich schwieriger von Monozyten abzugrenzen, weshalb für die ghanaische Kohorte bewusst ein kleineres Lymphozyten-*Gate* verwendet wurde. (Abb. 4) Auch zu kleine bzw. avitale Zellen wurden linksseitig des *Gates* ausgegrenzt. Die Viabilitätsprüfung der Zellen erfolgte mithilfe des nächsten *Gates*. Dabei wurden die Lymphozyten im FSC gegen Via-e780 dargestellt. So wurden nur die Via-negativen, lebenden Zellen für die weitere Analyse herausgefiltert. Anschließend wurden die lebenden Zellen weiter *gegattet*, wobei sie anhand der Expression von CD8 gegen CD4 sortiert wurden. Doppeltpositive, wie auch doppeltnegative und einfachpositive Zellen für CD8 wurden dabei ausgeschlossen. Die so ausgewählten vitalen CD4+/CD8- T-Zellen stellten die Grundlage für alle folgenden Analysen dar. Diese wurden zunächst auf die Expression der Oberflächenmarker CD127 gegen CD25 untersucht, auf welchen das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag. Dabei wurde zudem die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Marker CD25 und CD127 berechnet. Außerdem wurden die CD4+ T-Zellen auf CD45RA gegen CCR7 (CD197) *gegattet*, um naive und Gedächtnis-T-Zellen zu charakterisieren. Dabei konnten vier verschiedene Populationen voneinander abgegrenzt werden: Naive T-Zellen (CD45RA+/CCR7+), Effektor-Gedächtniszellen, die CD45RA re-exprimieren (CD45RA+/CCR7-), Zentrale Gedächtniszellen (CD45RA-/CCR7+) sowie Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA-/CCR7-). Diese vier T-Zell-*Subsets* wurden in einem letzten Schritt auf die Marker CD127 und CD25 *gegattet*, um die Expression derer auf den naiven und Gedächtnis-Zellen darzustellen. Das *Gating* sowie die Auswertung der Daten beider Kohorten erfolgten durch mich, unter Supervision von Frau PD Dr. Julia Seyfarth und Herrn Prof. Dr. Jacobsen.

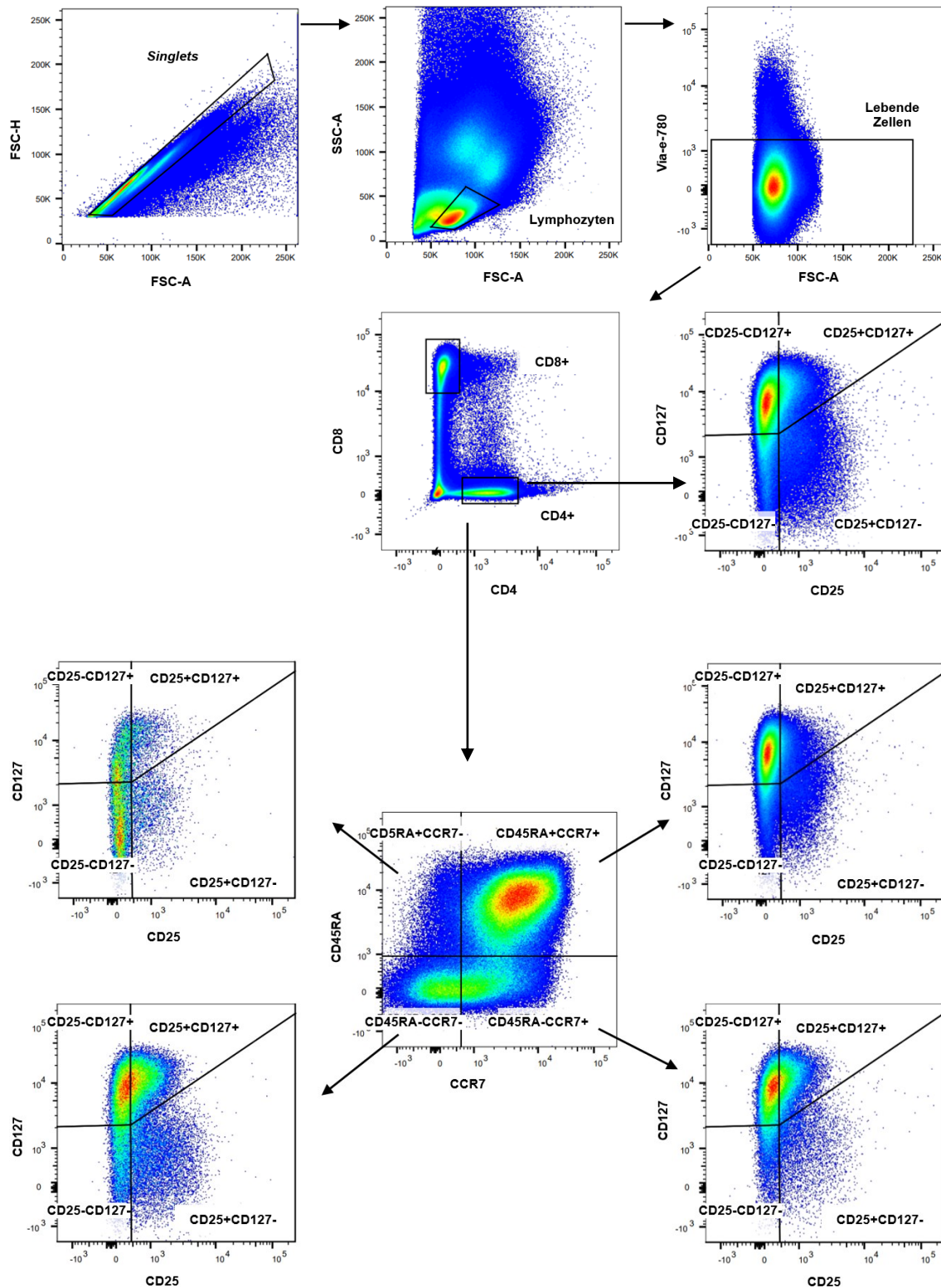


Abb. 3 - *Gating-Strategie* für die Auswertung der Oberflächenmarker (Deutsche Kohorte).
Eigene Abbildung.

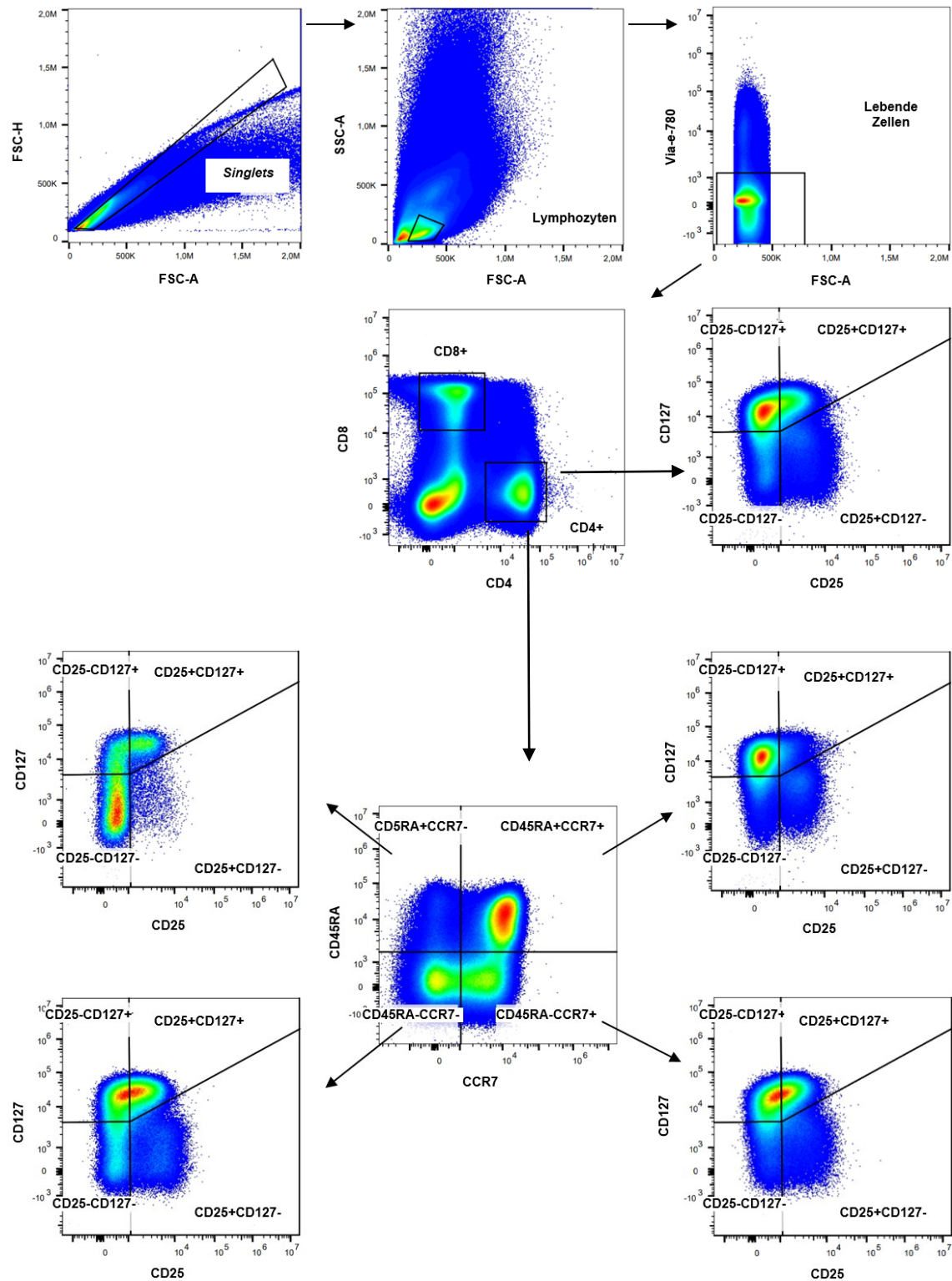


Abb. 4 - *Gating-Strategie* für die Auswertung der Oberflächenmarker (Ghanaische Kohorte).
Eigene Abbildung.

2.2.8 Erfassung klinischer Parameter

Die klinischen Parameter der StudienteilnehmerInnen, die für die anschließenden Gruppeneinteilungen und Korrelationsanalysen relevant waren, wurden pseudonymisiert erfasst. Dazu zählten die Parameter Geschlecht, Alter bei Rekrutierung, BMI sowie bei T1D-PatientInnen zusätzlich Manifestationsalter, Erkrankungsdauer und HbA1c. Diese Daten wurden für die deutschen StudienteilnehmerInnen dem klinischen Dokumentationssystem CGM MEDICO des Universitätsklinikums Düsseldorf entnommen, wie auch aus dem DDZ übermittelt. Die Daten der ghanaischen ProbandInnen wurden in Anamnesebögen dokumentiert und anschließend digitalisiert. Meine Aufgabe bestand dabei in der Erstellung einer einheitlichen Datei zur Dokumentation sowie in der Erfassung und Dokumentation pseudonymisierter klinischer Daten der deutschen Kohorte. Die pseudonymisierten klinischen Daten der ghanaischen Kohorte wurden mir von Mitgliedern des KCCR zur Verfügung gestellt.

2.2.9. Einteilung der StudienteilnehmerInnen

Die StudienteilnehmerInnen wurden in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen T1D-PatientInnen mit einer Erkrankungsdauer von mindestens einem Jahr und zum anderen gesunde StudienteilnehmerInnen ohne Autoimmun-, Tumor- und akute oder chronische Infektionserkrankungen. Anhand der Parameter Alter bei Rekrutierung, BMI und Geschlecht wurden beide Gruppen von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe gematcht, um so vergleichbare Paare für die folgenden Analysen auszuwählen. Für die ghanaische Kohorte konnten somit 84 T1D-PatientInnen und 84 gematchte, gesunde Kontrollen ausgewählt werden. Für die deutsche Kohorte wurden 56 T1D-PatientInnen und 56 gesunde Kontrollen ausgewählt. (Tabelle 8) Die Immunphänotypisierungs- sowie die klinischen Daten beider Kohorten wurden dann für die finalen Analysen verwendet.

Tabelle 8 - Charakteristika der Studienkohorten

Eigenschaften	Ghanaische Kohorte		Deutsche Kohorte	
	T1D-PatientInnen	Gesunde Kontrollen	T1D-PatientInnen	Gesunde Kontrollen
Anzahl (n)	84	84	56	56
Geschlecht (w/m)	48/36	48/36	24/32	24/32

Eigenschaften	Ghanaische Kohorte		Deutsche Kohorte	
	T1D-PatientInnen	Gesunde Kontrollen	T1D-PatientInnen	Gesunde Kontrollen
BMI (kg/m²)	22,4	23,1	20,3	19,7
HbA1c (%)	10,4	-	7,7	-
Alter (Jahre)	7-63	6-62	4-65	5-62
Mittelwert	25,80	25,75	19,41	18,80
Median	20,5	21,0	14,65	13,0
Erkrankungsdauer (Jahre)	7,2	-	5,0	-

In der Tabelle werden die Charakteristika der Studienkohorten angegeben, wobei die Parameter Anzahl (n), Geschlechterverteilung (m = männlich; w = weiblich), BMI (kg/m²), HbA1c (%) sowie Alter (Jahre) und Erkrankungsdauer (Jahre) berücksichtigt werden.

2.2.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 8.0). Für die Auswertung nicht-parametrischer, unabhängiger Proben wurden der Mann-Whitney-U-Test, der Kruskal-Wallis-Test sowie der Dunn's-Test angewendet. Korrelations-Analysen von nicht-parametrischen Daten erfolgten mittels Spearman-Korrelation. Die statistische Analyse erfolgte durch mich, unter Supervision von Frau PD Dr. Julia Seyfarth.

2.2.11 Aktenzeichen der Ethikvota

Die ProbandInnenrekrutierung sowie entsprechende Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät Düsseldorf (Studennummer: 2019-423-KFogU) sowie durch das *Komfo Anokye Teaching Hospital Institutional Review Board* (KATH IRBC CR01 081 22) genehmigt.

3 Ergebnisse

3.1 IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression auf CD4⁺ T-Zellen

Die Relevanz der IL-2- und IL-7-Rezeptorexpression in der T1D-Pathogenese ist bekannt, wobei IL-2 die Treg Entwicklung und Funktion fördert, während IL-7 eine wesentliche Rolle in der Entwicklung autoreaktiver Effektor-T-Zellen spielt. (1.5) Zudem deuten vorausgegangene Studien auf einen protektiven, antiinflammatorischen Effekt doppeltpositiver T-Zellen (CD25⁺/CD127⁺) in der T1D-Pathogenese hin. (1.5) Ob sie jedoch auch bei Langzeit-T1D-PatientInnen eine Rolle spielen und ob sie einen Einfluss auf den klinischen Verlauf haben, ist derzeit noch unbekannt. Daher wurde in einem ersten Analyseschritt die Expression beider Rezeptoren auf CD4⁺ T-Zellen zwischen Langzeit-T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen verglichen. Um potenzielle Unterschiede in der IL-2-Rezeptor- α - (CD25) und IL-7-Rezeptor- α - (CD127) Expression zwischen T1D-PatientInnen und Kontrollen zu betrachten, wurden die durchflusszytometrisch gemessenen PBMCs auf CD4⁺ T-Zellen *gagatet* (2.2.7) und zunächst die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Marker CD25 und CD127 kalkuliert. In der Analyse der ghanaischen Kohorte konnte dabei gezeigt werden, dass sowohl der Marker CD25 ($p=0,0301$) als auch der Marker CD127 ($p=0,0003$) stärker in der T1D-Gruppe ausgeprägt waren als in der Kontrollgruppe. (Abb. 5 A) In der Analyse der deutschen Kohorte zeigte sich lediglich eine stärkere MFI von CD127 bei T1D-PatientInnen im Vergleich zur Kontrollgruppe, was statistisch jedoch nur eine Tendenz ($p=0,0858$) aufwies. Für den Marker CD25 war kein Unterschied ersichtlich. (Abb. 5 B)

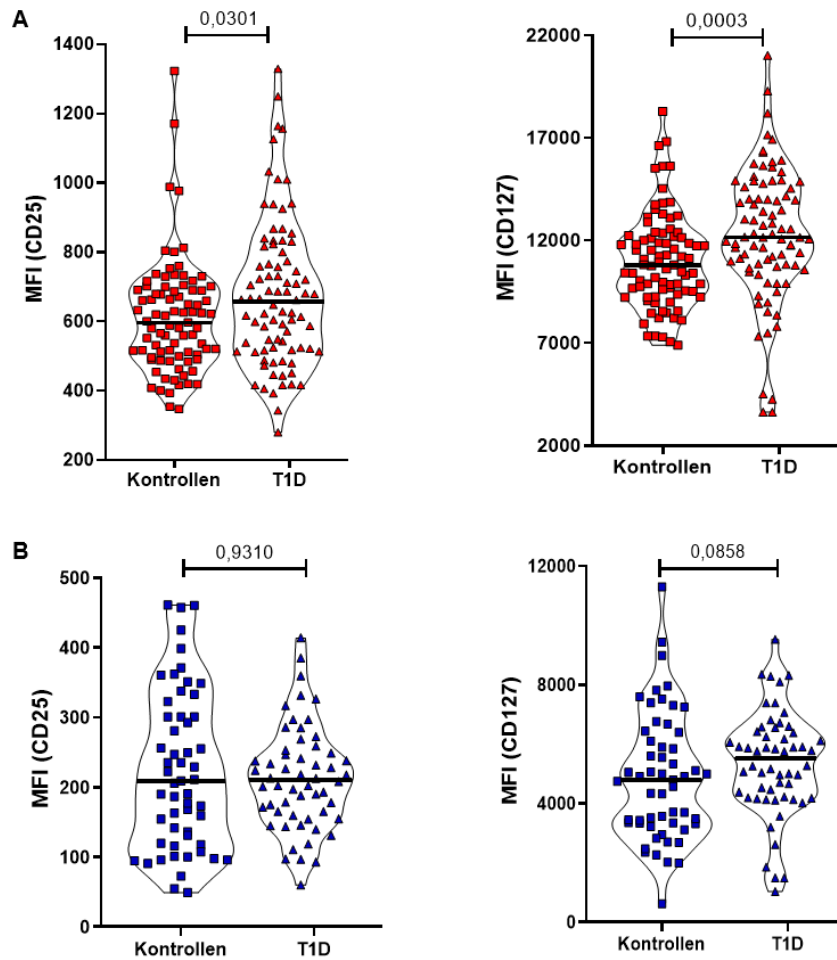


Abb. 5 - Mittlere Fluoreszenzintensität für CD25 und CD127 auf CD4+ T-Zellen

Gezeigt wird die Mittlere Fluoreszenzintensität „MFI“ für die Marker CD25 und CD127 auf CD4+ T-Zellen. Diese wurde im Rahmen der Auswertung von Oberflächenmarkern der durchflusszytometrisch untersuchten Zellen berechnet. Die Daten der ghanaischen Kohorte (rot) werden in den oberen beiden Graphen (A), die Daten der deutschen Kohorte (blau) in den unteren beiden Graphen (B) dargestellt. Das linke Violinendiagramm repräsentiert jeweils die Kontrollgruppe „Kontrollen“ (Vierecke, Ghana: n=84/Deutschland: n=56), das rechte Violinendiagramm die PatientInnengruppe „T1D“ (Dreiecke, Ghana: n=84/Deutschland: n=56). Die schwarzen Querbalken kennzeichnen den Median. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Exakte p-Werte sind als Dezimalzahlen angegeben.

In einer folgenden Darstellung wurde die CD25 und CD127 Expression (%) auf T-Zellen von PatientInnen und gesunden ProbandInnen verglichen. (Abb. 6) Dabei wurden die CD4+ T-Zellen mithilfe einer einheitlichen *Gating*-Strategie (2.2.7) anhand ihrer Oberflächenexpression in Doppeltpositive (CD25+/CD127+), je CD25 Einfachpositive (CD25+/CD127-) und CD127 Einfachpositive (CD25-/CD127+) sowie Doppeltnegative (CD25-/CD127-) unterteilt. In der Analyse der ghanaischen Kohorte (Abb. 6 A) konnte so ein größerer Anteil Doppeltpositiver ($p=0,0417$) in der T1D-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Zudem war in der T1D-Gruppe ein geringerer Anteil Doppeltnegativer erkennbar, als in der Kontrollgruppe ($p=0,0014$). In der Analyse der CD25/CD127 einfachpositiven T-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen PatientInnen und Kontrollen gezeigt werden. In der Analyse der deutschen Kohorte (Abb. 6 B) war ebenfalls ein geringerer Anteil Doppeltnegativer in der T1D-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen ($p=0,0392$). Außerdem zeigte sich hier ein größerer Anteil CD127 Einfachpositiver in der T1D-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0043$). Im Hinblick auf Doppeltpositive und CD25 Einfachpositive zeigten sich in der deutschen Kohorte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Es zeigte sich also in beiden Kohorten eine vermehrte CD127 Expression auf CD4+ T-Zellen von T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen, wobei in PatientInnen der ghanaischen Kohorte ein größerer Anteil Doppeltpositiver und in PatientInnen der deutschen Kohorte ein größerer Anteil CD127 Einfachpositiver im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu finden war. (Abb. 5-6)

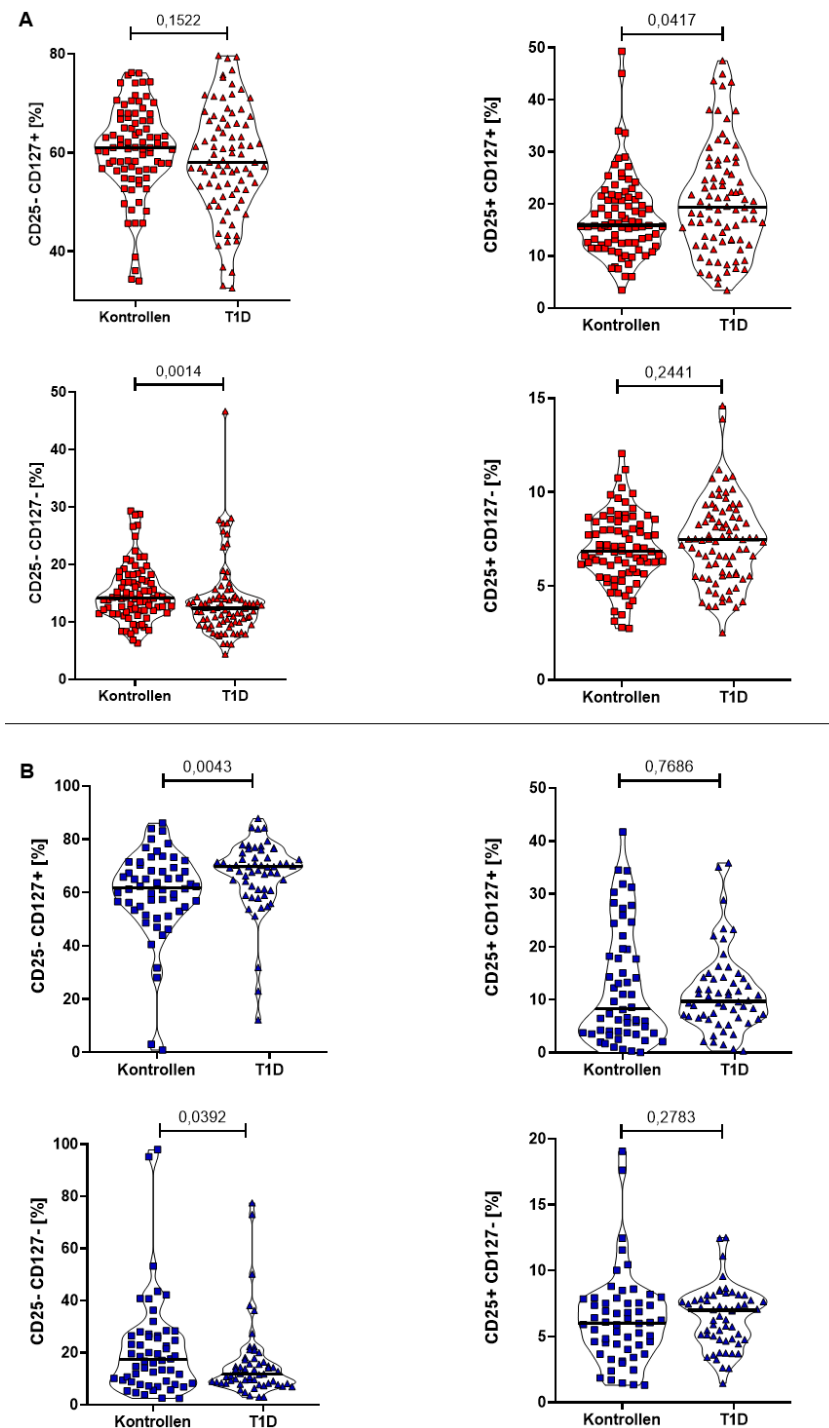


Abb. 6 - Anteile von CD25 und CD127 auf CD4+ T-Zellen [%]

Gezeigt werden die Anteile der Oberflächenmarker CD25 und CD127 auf CD4+ T-Zellen (%). Dabei wurden im Rahmen des *Gatings* der durchflusszytometrisch gemessenen Zellen vier Gruppen unterteilt: Doppeltpositive (CD25+CD127+), je einfachpositive (CD25+CD127-/CD25-CD127+) und doppeltnegative (CD25-CD127-) T-Zellen. Die Daten der ghanaischen Kohorte (rot) werden oberhalb der Trennlinie (A), die Daten der deutschen Kohorte (blau) unterhalb der Trennlinie (B) dargestellt. Das linke Violinendiagramm repräsentiert jeweils die Kontrollgruppe „Kontrollen“ (Vierecke, Ghana: n=84/Deutschland: n=56), das rechte Violinendiagramm die PatientInnengruppe „T1D“ (Dreiecke, Ghana: n=84/Deutschland: n=56). Die schwarzen Querbalken kennzeichnen den Median. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Exakte p-Werte sind als Dezimalzahlen angegeben.

3.2 IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen

Ziel der folgenden Analyse war es, zu bestimmen, auf welchen naiven und Gedächtnis-T-Zellen die genannten Rezeptoren doppelpositiv oder einfachpositiv exprimiert werden und ob zwischen den naiven und Gedächtnis-Zellen Unterschiede in der CD25/CD127 Expression bestehen.

Dazu wurden die CD4⁺ T-Zellen, mittels eines einheitlichen *Gatings* (2.2.7) auf die Oberflächenmarker CCR7 (*Chemokine Receptor 7*) und CD45RA (*Cluster of differentiation 45RA*), in vier T-Zell-Subsets unterteilt. Erstens CD45RA⁺/CCR7⁺ Naive T-Zellen (T_N); zweitens CD45RA⁺/CCR7⁻ Effektor-Gedächtniszellen, die CD45RA re-exprimieren (T_{EMRA}); drittens CD45RA⁻/CCR7⁺ Zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) und viertens CD45RA⁻/CCR7⁻ Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}). Anschließend wurden die Anteile Doppelpositiver bzw. CD127⁺ Einfachpositiver zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen beider Kohorten verglichen. (Abb. 7)

Dabei konnten stark variierende Anteile Doppelpositiver bzw. CD127 Einfachpositiver in naiven und Gedächtnis-T-Zellen der ProbandInnen beider Kohorten gezeigt werden. Sowohl in der ghanaischen Kohorte (Abb. 7 A) als auch in der deutschen Kohorte (Abb. 7 B) war der Anteil Doppelpositiver am höchsten bei T_{CM} und T_{EM} ($p < 0,0001$). Der höchste Anteil CD127 Einfachpositiver zeigte sich in beiden Kohorten bei T_N und T_{CM}, der geringste Anteil hingegen bei T_{EMRA}. ($p < 0,0001$)

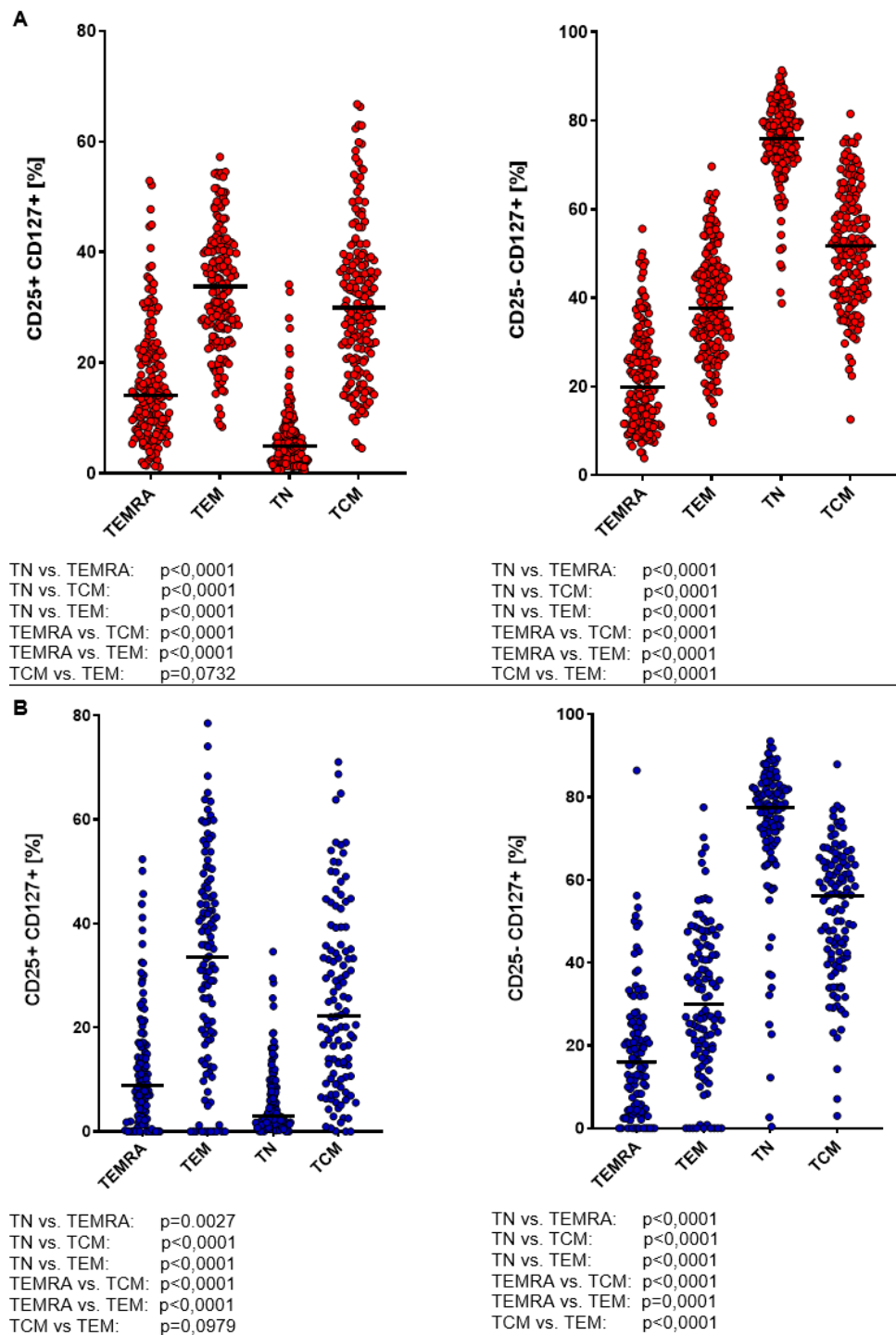


Abb. 7 - Anteile von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen [%]

Gezeigt werden die Anteile von Doppeltpositiven (CD25+/CD127+) (links) sowie von Einfachpositiven (CD25-/CD127+) (rechts) auf CD4+ naiven und Gedächtnis-T-Zellen (%). Im Rahmen der Auswertung der durchflusszytometrisch gemessenen Zellen wurden naive und Gedächtnis-T-Zellen auf die Marker CD25 und CD127 *gegetet*. Die Daten der ghanaischen ProbandInnen (rot, n=168) werden oberhalb der Trennlinie (A), die Daten der deutschen ProbandInnen (blau, n=112) unterhalb der Trennlinie (B) dargestellt. Die naiven und Gedächtnis-T-Zellen werden wie folgt von links nach rechts dargestellt: CD45RA+CCR7- Effektor-Gedächtnis-Zellen, die CD45RA re-exprimieren „TEMRA“, CD45RA-CCR7- Effektor-Gedächtniszellen „TEM“, CD45RA+CCR7+ Naive T-Zellen „TN“, CD45RA-CCR7+ Zentrale Gedächtnis-Zellen „TCM“. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden der Kruskal-Wallis- sowie der Dunn's-Test angewendet. Individuelle p-Werte sind unterhalb der jeweiligen Graphen als Dezimalzahlen angegeben.

3.3 Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen in T1D-PatientInnen und Kontrollen

Um zu prüfen, ob die in 3.1 beobachteten Unterschiede in den Anteilen doppeltpositiver und CD127 einfachpositiver T-Zellen zwischen T1D-PatientInnen und Kontrollen durch unterschiedliche Proportionen naiver und Gedächtnis-T-Zellen erklärt werden könnten, die eine unterschiedliche CD25/CD127 Expression aufweisen, (3.2) wurden in einem folgenden Schritt die Proportionen CD4⁺ naiver und Gedächtnis-T-Zellen zwischen T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen verglichen. (Abb. 8)

In der Analyse der ghanaischen Kohorte (Abb. 8 A) zeigte die PatientInnengruppe eine signifikant größere Proportion von T_{CM} als die Kontrollgruppe (p=0,0030). In der Analyse der deutschen Kohorte (Abb. 8 B) zeigte sich eine signifikant geringere Proportion von T_{EMRA} in T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen (p=0,0010). Die Proportionen der weiteren naiven und Gedächtnis-T-Zellen zeigten keine signifikante Varianz zwischen PatientInnen und Kontrollen.

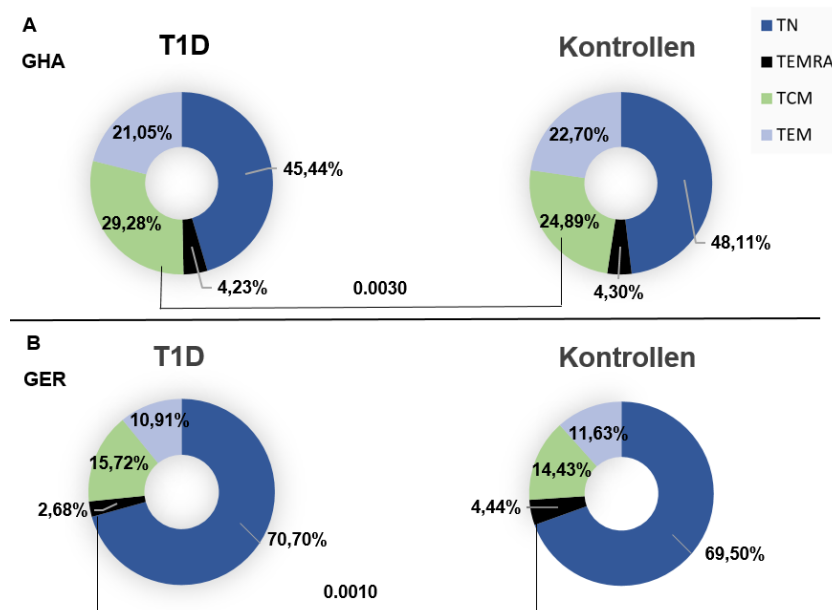


Abb. 8 - Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen an CD4⁺ T-Zellen [%]

Dargestellt werden die Proportionen der zuvor definierten naiven und Gedächtnis-T-Zellen an CD4⁺ T-Zellen (%) in T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen: CD45RA+CCR7⁺ Naive T-Zellen „TN“ (dunkelblau), CD45RA+CCR7⁻ Effektor-Gedächtniszellen, die CD45RA re-exprimieren „TEMRA“ (schwarz), CD45RA-CCR7⁺ Zentrale Gedächtniszellen „TCM“ (grün) und CD45RA-CCR7⁻ Effektor-Gedächtniszellen „TEM“ (hellblau). Die Analysen der ghanaischen Kohorte „GHA“ (A) sind oberhalb der Trennlinie und die Analysen der deutschen Kohorte „GER“ (B) unterhalb der Trennlinie dargestellt. Das jeweils linke Donut-Diagramm repräsentiert die Gruppe der T1D-PatientInnen „T1D“ (Ghana: n=84/Deutschland: n=56). Das jeweils rechte Donut-Diagramm repräsentiert die Kontrollgruppe „Kontrollen“ (Ghana: n=84/Deutschland: n=56). Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Exakte p-Werte sind, wenn signifikant, als Dezimalzahlen angegeben.

3.4 IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen in T1D-PatientInnen und Kontrollen

Anschließend wurde untersucht, ob über die unterschiedlichen *Memory Subset*-Proportionen hinaus auch innerhalb der einzelnen naiven und Gedächtnis-T-Zellen Unterschiede in der CD25/CD127 Expression zwischen T1D-PatientInnen und Kontrollen bestehen. Dazu wurden die Anteile Doppeltpositiver bzw. Einfachpositiver in naiven und Gedächtnis-T-Zellen von PatientInnen und Kontrollen verglichen. Dafür wurden die anhand von CD45RA und CCR7 definierten naiven und Gedächtnis-T-Zellen abhängig von ihrer CD25 und CD127 Expression in vier Quadranten unterteilt. (2.2.7)

In der Analyse der ghanaischen Kohorte wurde ein signifikant größerer Anteil von Doppeltpositiven in T_{EMRA} von PatientInnen als in T_{EMRA} von Kontrollen deutlich ($p=0,0089$). In der deutschen Kohorte konnte ein signifikant größerer Anteil von CD127 Einfachpositiven in T_N von T1D-PatientInnen als in T_N von Kontrollen gezeigt werden ($p=0,0033$). (Abb. 9) In den übrigen naiven und Gedächtnis-T-Zellen zeigten sich in beiden Kohorten keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen Doppelt- bzw. Einfachpositiver zwischen PatientInnen und Kontrollen. (Anhang, Abb. 14-15)

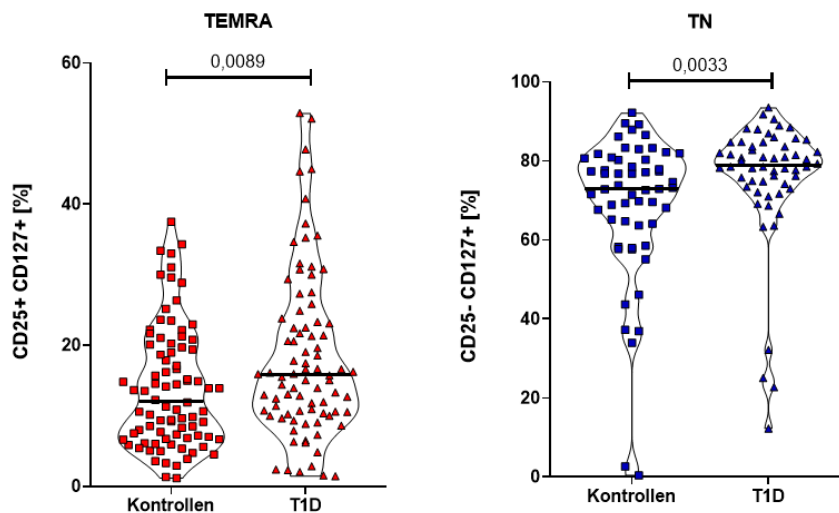


Abb. 9 - Anteile von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ in spezifischen *Memory Subsets* [%]

Dargestellt werden die Anteile von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ in ausgewählten *Memory Subsets* (%). Im Rahmen der Auswertung der durchflusszytometrisch gemessenen Zellen wurden die zuvor definierten naiven und Gedächtniszellen auf die Marker CD25 und CD127 *geatet*. Der linke Graph stellt den Anteil von CD25+/CD127+ auf CD45RA- CCR7- „TEMRA“ der ghanaischen Kohorte (rot) dar. Der rechte Graph stellt den Anteil von CD25-/CD127+ auf CD45RA+ CCR7+ „TN“ der deutschen Kohorte (blau) dar. Das linke Violinendiagramm repräsentiert jeweils die Kontrollgruppe „Kontrollen“ (Vierecke, Ghana: n=84/Deutschland: n=56), das rechte Violinendiagramm die PatientInnengruppe „T1D“ (Dreiecke, Ghana: n=84/Deutschland: n=56). Die schwarzen Querbalken kennzeichnen den Median. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Exakte p-Werte sind als Dezimalzahlen angegeben.

3.5 Assoziation der IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression mit dem klinischen Phänotyp der ProbandInnen

In vorausgegangenen Studien konnte der klinische Phänotyp von PatientInnen mit der Entstehung autoimmuner Erkrankungen, wie dem T1D, assoziiert werden. [43, 44] Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die Immunphänotypisierungsdaten der ProbandInnen mit klinischen Parametern zu assoziieren. Da in den vorherigen Analysen ein größerer Anteil doppeltpositiver T-Zellen in PatientInnen der ghanaischen Kohorte sowie ein größerer Anteil CD127 einfachpositiver T-Zellen in PatientInnen der deutschen Kohorte gezeigt werden konnte, (3.1) erfolgte zuletzt die Assoziation dieser Doppelpositiven und Einfachpositiven mit ausgewählten klinischen Parametern der ProbandInnen.

Für die T1D-Gruppen erfolgte die Assoziation mit dem Alter bei Rekrutierung, dem Manifestationsalter, der Erkrankungsdauer und dem HbA1c. Für die Kontrollgruppen wurde nur der Parameter Alter bei Rekrutierung korreliert. Dabei wurde jeweils der klinische Parameter (X-Achse) gegen den Anteil der Doppelpositiven bzw. Einfachpositiven (%) (Y-Achse) dargestellt.

3.5.1 Alter bei Rekrutierung

Bei der Korrelation Doppeltpositiver mit dem Alter bei Rekrutierung konnte sowohl in ghanaischen T1D-PatientInnen ($p < 0,0001$) als auch in deutschen T1D-PatientInnen ($p = 0,0108$) ein positiver linearer Zusammenhang festgestellt werden. In der ghanaischen Kohorte zeigte sich zudem auch in der Kontrollgruppe ($p = 0,0491$) ein positiver linearer Zusammenhang zwischen Doppeltpositiven und dem Alter bei Rekrutierung. (Abb. 10 A, C)

Außerdem konnte ein negativer linearer Zusammenhang zwischen Einfachpositiven und dem Alter bei Rekrutierung in ghanaischen T1D-PatientInnen ($p = 0,0018$) gezeigt werden. In der ghanaischen Kontrollgruppe sowie in der deutschen Kohorte war kein signifikanter Zusammenhang zwischen einfachpositiven T-Zellen und dem Alter bei Rekrutierung nachweisbar. (Abb. 10 B, D)

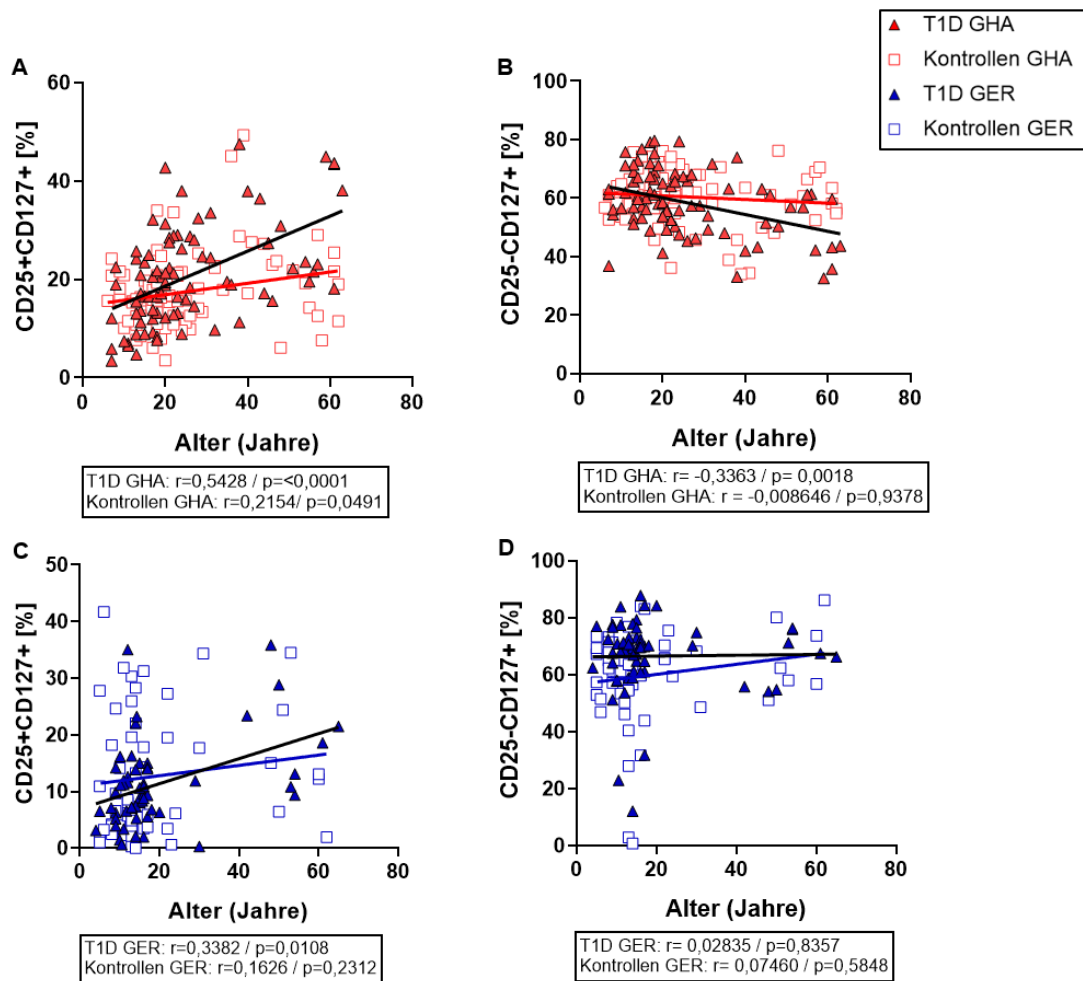


Abb. 10 - Korrelation von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ T-Zellen mit dem Alter bei Rekrutierung.

In den linken Graphen wird das Alter bei Rekrutierung (Jahre) mit der Expression von CD25+/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%) gegenübergestellt. In den rechten Graphen erfolgt die Gegenüberstellung des Alters bei Rekrutierung (Jahre) mit der Expression von CD25-/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%). Dabei werden T1D-PatientInnen (Dreiecke) und Kontrollen (Vierecke) der ghanaischen Kohorte „GHA“ in Rot (A, B) und der deutschen Kohorte „GER“ in Blau (C, D) dargestellt. Rangkorrelationskoeffizient (r) und Signifikanzwert (p) wurden mittels Spearman-Korrelation kalkuliert und sind unterhalb der Graphen angegeben. Regressionslinien: T1D = schwarz; Kontrollen = rot (GHA) bzw. blau (GER).

3.5.2 Manifestationsalter

Bei Assoziation des Manifestationsalters mit doppelpositiven T-Zellen (Abb. 11 A) zeigte sich in ghanaischen T1D-PatientInnen ein positiver linearer Zusammenhang ($p<0,0001$), wohingegen bei Assoziation mit einfachpositiven T-Zellen (Abb. 11 B) ein negativer linearer Zusammenhang deutlich wurde ($p=0,0163$). In der deutschen Kohorte waren keine signifikanten Unterschiede messbar. (Abb. 11 C, D)

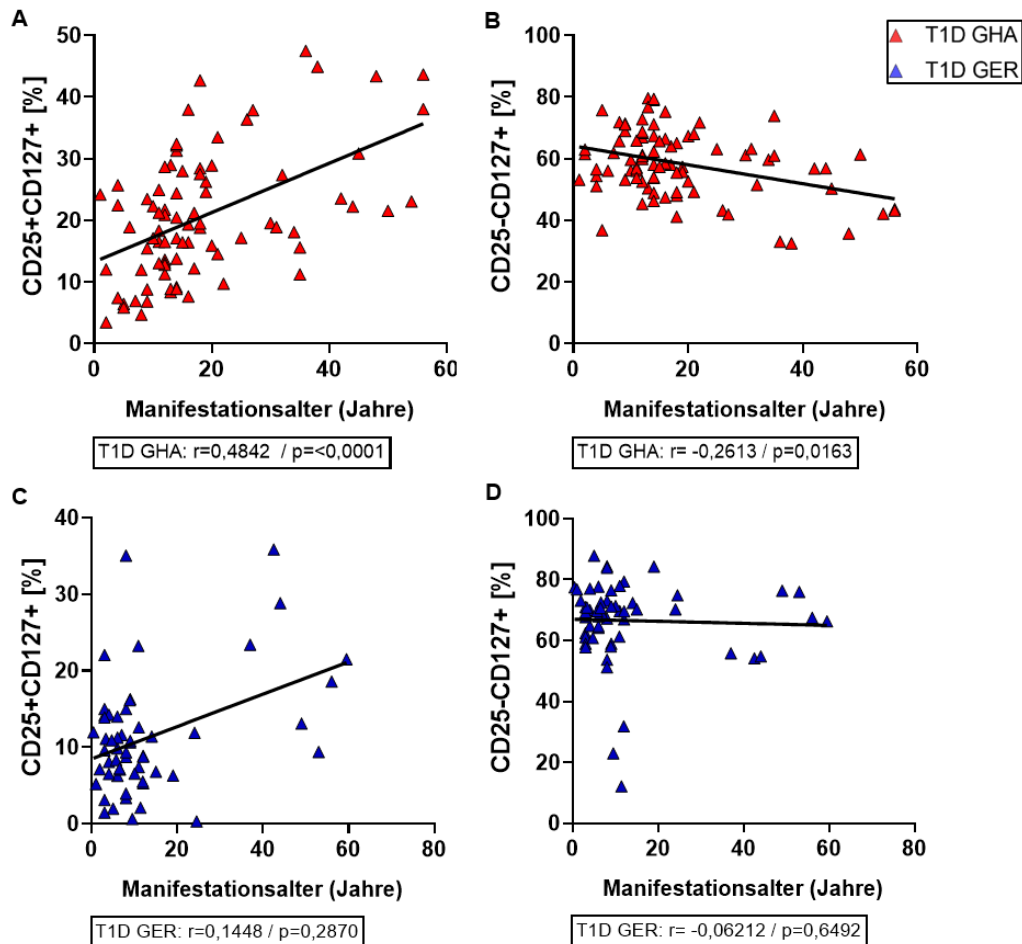


Abb. 11 - Korrelation von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ T-Zellen mit dem Manifestationsalter.

In den linken Graphen wird das Manifestationsalter (Jahre) mit der Expression von CD25+/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%) gegenübergestellt. In den rechten Graphen erfolgt die Gegenüberstellung des Manifestationsalters (Jahre) mit der Expression von CD25-/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%). Dabei werden die T1D-PatientInnen (Dreiecke) der ghanaischen Kohorte „GHA“ in Rot (A, B) und der deutschen Kohorte „GER“ in Blau (C, D) dargestellt. Rangkorrelationskoeffizient (r) und Signifikanzwert (p) wurden mittels Spearman-Korrelation kalkuliert und sind unterhalb der Graphen angegeben. Die Regressionslinien sind in schwarz dargestellt.

3.5.3 Erkrankungsdauer

In T1D-PatientInnen der ghanaischen Kohorte ($p=0,0077$) wie auch in T1D-PatientInnen der deutschen Kohorte ($p=0,0475$), konnten positive lineare Zusammenhänge zwischen Doppelpositiven und der Erkrankungsdauer herausgestellt werden. (Abb. 12 A, C)

Zwischen Einfachpositiven und der Erkrankungsdauer zeigte sich in ghanaischen PatientInnen wiederum ein negativer linearer Zusammenhang ($p=0,0415$). (Abb. 12 B)

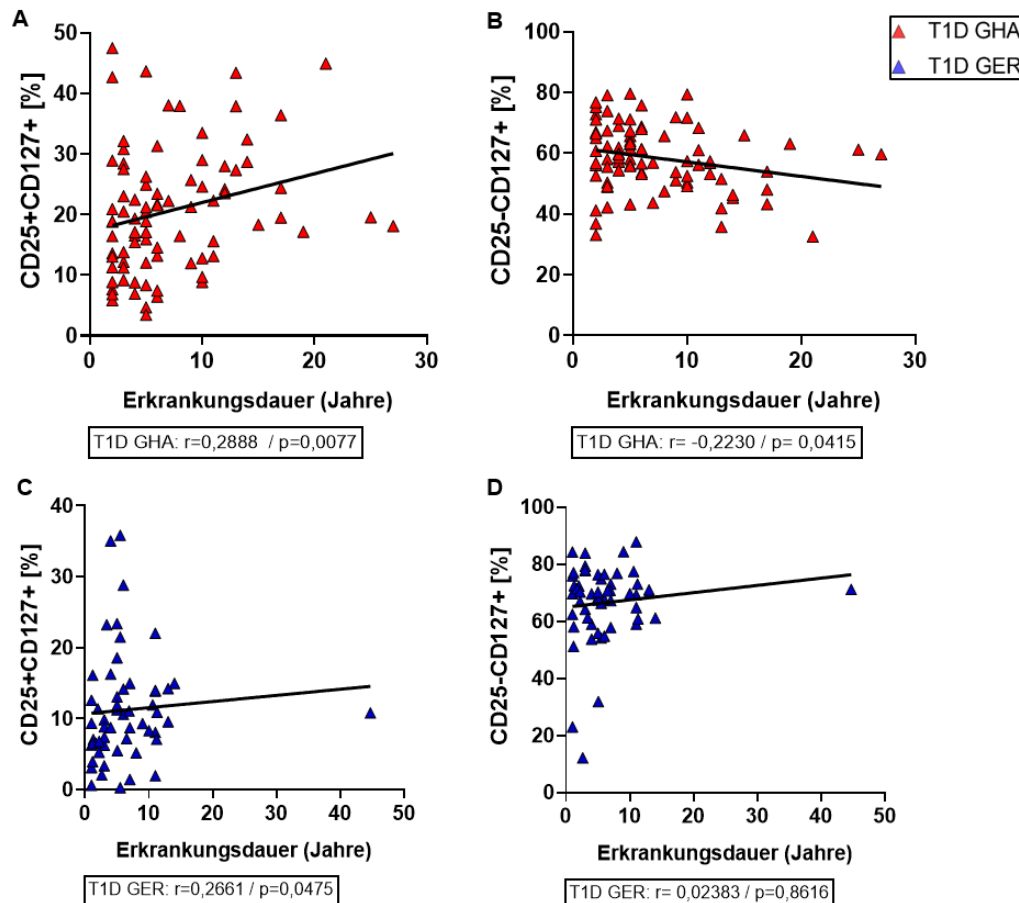


Abb. 12 - Korrelation von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ T-Zellen mit der Erkrankungsdauer.

In den linken Graphen wird die Erkrankungsdauer (Jahre) mit der Expression von CD25+/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%) gegenübergestellt. In den rechten Graphen erfolgt die Gegenüberstellung der Erkrankungsdauer (Jahre) mit der Expression von CD25-/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%). Dabei werden die T1D-PatientInnen (Dreiecke) der ghanaischen Kohorte „GHA“ in Rot (A, B) und der deutschen Kohorte „GER“ in Blau (C, D) dargestellt. Rangkorrelationskoeffizient (r) und Signifikanzwert (p) wurden mittels Spearman-Korrelation kalkuliert und sind unterhalb der Graphen angegeben. Die Regressionslinien sind in schwarz dargestellt.

3.5.4 HbA1c

Zuletzt erfolgte die Assoziation doppelt- und einfachpositiver T-Zellen mit dem HbA1c der T1D-PatientInnen. (Abb. 13) Dabei zeigte sich in der ghanaischen Kohorte ein negativer linearer Zusammenhang zwischen Doppeltpositiven und dem HbA1c ($p=0,0136$) und ein positiver linearer Zusammenhang zwischen Einfachpositiven und dem HbA1c ($p=0,0006$). (Abb. 13 A, B) In der deutschen Kohorte ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge ermitteln. (Abb. 13 C, D)

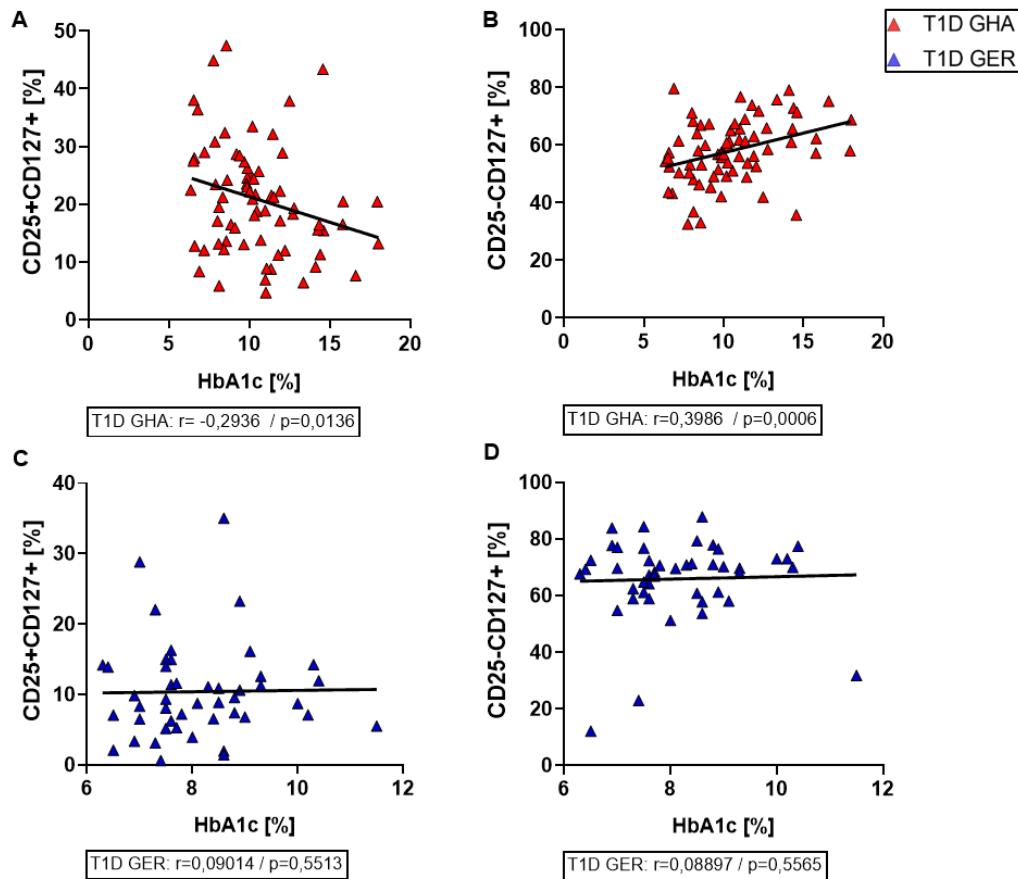


Abb. 13 - Korrelation von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ T-Zellen mit dem HbA1c.

In den linken Graphen wird der HbA1c (%) mit der Expression von CD25+/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%) gegenübergestellt. In den rechten Graphen erfolgt die Gegenüberstellung des HbA1c (%) mit der Expression von CD25-/CD127+ auf CD4+ T-Zellen (%). Dabei werden die T1D-PatientInnen (Dreiecke) der ghanaischen Kohorte „GHA“ in Rot (A, B) und der deutschen Kohorte „GER“ in Blau (C, D) dargestellt. Rangkorrelationskoeffizient (r) und Signifikanzwert (p) wurden mittels Spearman-Korrelation kalkuliert und sind unterhalb der Graphen angegeben. Die Regressionslinien sind in schwarz dargestellt.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mithilfe der oben erläuterten Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die Expression des IL-2- und IL-7-Rezeptor- α in T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen unterscheidet. In beiden Kohorten zeigte sich eine vermehrte CD127 Expression auf CD4+ T-Zellen von T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen. Dabei wurde ein größerer Anteil Doppeltpositiver in T1D-PatientInnen der ghanaischen Kohorte sowie ein größerer Anteil CD127 Einfachpositiver in T1D-PatientInnen der deutschen Kohorte im Vergleich zu Gesunden deutlich. (3.1)

In beiden Studienkohorten waren vor allem bei T_{EM} und T_{CM} hohe Anteile Doppeltpositiver zu erkennen, wohingegen die niedrigsten Anteile Einfachpositiver in T_{EMRA} zu finden waren. (3.2) Des Weiteren konnten unterschiedliche Proportionen von naiven und Gedächtniszellen an der Gesamtzahl der CD4+ T-Zellen bei T1D-

PatientInnen und gesunden Kontrollen gezeigt werden. Dabei wurde eine größere Proportion von T_{CM} in T1D-PatientInnen der ghanaischen Kohorte sowie eine geringere Proportion von T_{EMRA} in T1D-PatientInnen der deutschen Kohorte im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich. (3.3) Außerdem zeigten sich auch innerhalb der naiven und Gedächtnis-T-Zellen unterschiedliche Anteile von doppelt- und einfachpositiven T-Zellen in T1D-PatientInnen und Kontrollen. In der ghanaischen Kohorte wurde dabei ein größerer Anteil Doppeltpositiver in T_{EMRA} von PatientInnen als in T_{EMRA} von Kontrollen deutlich. In der deutschen Kohorte zeigte sich ein größerer Anteil Einfachpositiver in T_N von T1D-PatientInnen als in T_N von Kontrollen. (3.4)

Abschließend waren im Rahmen der Korrelationsanalysen in der deutschen Kohorte positive lineare Zusammenhänge zwischen Doppeltpositiven und dem Alter bei Rekrutierung und der Erkrankungsdauer von T1D-PatientInnen ersichtlich. (3.5) In ghanaischen T1D-PatientInnen wurden ebenfalls positive lineare Zusammenhänge zwischen Doppeltpositiven und den Parametern Alter bei Rekrutierung, Manifestationsalter und Erkrankungsdauer festgestellt. Zwischen doppeltpositiven T-Zellen und dem HbA1c zeigte sich jedoch ein negativer linearer Zusammenhang in der ghanaischen Kohorte. Dahingegen ergab die Assoziation CD127 Einfachpositiver mit klinischen Parametern in ghanaischen T1D-PatientInnen negative lineare Zusammenhänge mit den Parametern Alter bei Rekrutierung, Manifestationsalter und Erkrankungsdauer sowie einen positiven linearen Zusammenhang mit dem HbA1c der T1D-PatientInnen. Doppelt- und einfachpositive T-Zellen korrelierten in ghanaischen T1D-PatientInnen somit jeweils entgegengesetzt mit den untersuchten klinischen Parametern. (3.5)

4 Diskussion

Die Relevanz der IL-2-Rezeptor- α -Kette (CD25) und der IL-7-Rezeptor- α -Kette (CD127) in der Pathogenese des T1D wurde bereits beschrieben. [102, 112, 115, 137, 138] Zudem wurde die Beteiligung autoreaktiver Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen an der Entstehung autoimmuner Erkrankungen beschrieben. [86, 92-94] Auch der klinische Phänotyp von T1D-PatientInnen wurde in vorausgegangenen Studien mit der T1D-Entstehung sowie seinem Erkrankungsmuster in Verbindung gebracht. [29, 43, 44, 152] Darauf aufbauend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Einblicke in die Rolle doppelpositiver T-Zellen in Langzeit-T1D-PatientInnen sowie Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Immunphänotyp und klinischem Phänotyp von PatientInnen und Kontrollen.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Erhöhte Expression der IL-7-Rezeptor- α -Kette in T1D-PatientInnen

Im Rahmen der Immunphänotypisierung konnten Unterschiede in der Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD127 zwischen T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen gezeigt werden. (3.1) Bei der Kalkulation der Mittleren Fluoreszenzintensität zeigten sich in der ghanaischen Kohorte sowohl eine stärkere MFI des Markers CD25 als auch des Markers CD127 in PatientInnen als in Kontrollen. (Abb. 5 A) In der deutschen Kohorte war lediglich eine stärkere MFI des Markers CD127 in PatientInnen als in Kontrollen erkennbar. (Abb. 5 B) Die Analyse der CD25/CD127 Quadranten ergab einen größeren Anteil doppelpositiver (CD25+/CD127+) T-Zellen in T1D-PatientInnen der ghanaischen Kohorte sowie einen größeren Anteil einfachpositiver (CD25-/CD127+) T-Zellen in PatientInnen in der deutschen Kohorte. (Abb. 6) Dies deutet darauf hin, dass die stärkere MFI des Markers CD127 in ghanaischen PatientInnen (Abb. 5 A) mit dem Vorkommen doppelpositiver T-Zellen und somit einer erhöhten Expression der IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Kette assoziiert ist, wohingegen die stärkere MFI von CD127 in deutschen PatientInnen (Abb. 5 B) mit dem Vorkommen einfachpositiver T-Zellen und somit lediglich einer erhöhten Expression der IL-7-Rezeptor- α -Kette assoziiert ist.

Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, konnte auch in anderen Studien eine erhöhte Expression des IL-7-Rezeptors in T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen gezeigt

werden. [144, 145] Die Expression der IL-7-Rezeptor- α -Kette wurde bereits mit der Förderung von autoreaktiver Effektor-Aktivität in Verbindung gebracht, [142, 143] weshalb die höhere Expression dieser auf T-Zellen von T1D-PatientInnen auf erhöhte Effektor-Aktivität hinweisen könnte. Ein höheres Vorkommen IL-7-Rezeptor einfachpositiver T-Zellen könnte demnach das in T1D beschriebene Ungleichgewicht zwischen regulatorischen und Effektor-T-Zellen fördern. [51]

Dass in T1D-PatientInnen ein größerer Anteil doppeltpositiver T-Zellen vorliegt, wie in der Analyse der ghanaischen Kohorte beschrieben, (3.1) kann ebenfalls durch Studien anderer Forschungsgruppen gestützt werden. [150, 151] Doppeltpositive T-Zellen wurden darin als antiinflammatorisch wirkende Zellen beschrieben, die eine hohe Anzahl von Typ-2-T-Helferzell-Zytokinen produzieren und so proinflammatorische Immunantworten in antiinflammatorische Immunantworten umwandeln können. [150, 151] Darüber hinaus wurden sie als protektiv in Bezug auf die Progression des T1D eingeschätzt. Es wird angenommen, dass sie zu einem prolongierten β -Zell-Erhalt und dadurch auch zu einer längeren partiellen Remissionsphase beitragen. [149, 151, 153] Zudem stellten Narsale et. al die Hypothese auf, dass die Ausbildung von doppeltpositiven T-Zellen das Level der Inflammation im T1D reflektiert. [151] Das höhere Vorkommen doppeltpositiver, antiinflammatorisch agierender T-Zellen in ghanaischen T1D-PatientInnen könnte somit Ausdruck einer gegenregulatorischen Immunantwort im Kontext des chronischen Entzündungsgeschehens sein. Vor diesem Hintergrund könnte der geringere Anteil einfachpositiver T-Zellen in der Kontrollgruppe (Abb. 6 B) auf das Fehlen autoimmuner Inflammation zurückführen sein.

Im Hinblick auf den Ländervergleich ist der Altersunterschied zwischen der deutschen und ghanaischen Kohorte zu erwähnen, (Tabelle 8) der diesen beeinflussen könnte. Angesichts der positiven Korrelation zwischen Alter und Doppeltpositiven in beiden Kohorten ist somit zu berücksichtigen, dass die abweichenden Ergebnisse beider Kohorten durch den Altersunterschied der ProbandInnen beeinflusst worden sein könnten. (3.5.1)

Zusammenfassend wurde in diesem Analyseschritt in beiden Kohorten eine vermehrte CD127 Expression auf CD4⁺ T-Zellen von T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen gezeigt. Dabei fiel auf, dass im Vergleich zu Gesunden in der ghanaischen Kohorte ein größerer Anteil Doppeltpositiver, in der deutschen Kohorte dagegen ein größerer Anteil Einfachpositiver zu finden war. Um herauszufinden, auf welchen naiven

und Gedächtnis-T-Zellen die genannten Rezeptoren lokalisiert sind, wurde im folgenden Schritt die Expression der IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Kette auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen analysiert.

4.1.2 Starke Variation der IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen

In 3.2 zeigten sich starke Unterschiede in den Anteilen Doppeltpositiver bzw. Einfachpositiver in naiven und Gedächtnis T-Zellen. In beiden Studienkohorten konnte ein signifikant größerer Anteil Doppeltpositiver in T_{CM} und T_{EM} , als in T_N und T_{EMRA} gezeigt werden. Zudem waren ein größerer Anteil Einfachpositiver bei T_{CM} und T_N sowie der geringste Anteil bei T_{EMRA} zu erkennen. (Abb. 7)

Unterstützend zu diesen Analyseergebnissen beschreiben Studien anderer Forschungsgruppen, dass auf T_{CM} und T_N eine höhere Expression der IL-7-Rezeptor- α -Kette besteht. Sie zeigten, dass der IL-7-Rezeptor eher auf naiven T-Zellen und Vorläuferzellen exprimiert wird und auf enddifferenzierten T-Zellen seltener auftritt. [131, 133] Kondrack et al. beschrieben dabei, dass das hohe Level der IL-7-Rezeptor- α -Kette auf $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen zu einem längeren Überleben dieser Zellen beitrage. [132] Auch der hohe Anteil Doppeltpositiver in T_{CM} und T_{EM} (Abb. 7) konnte in Studien anderer Forschungsgruppen ebenfalls gezeigt werden. Diese beschrieben, dass $CD25^+CD127^{high}$ ($CD25^+CD127^{hi}$) Zellen zu über 95% einen Effektor- und Gedächtnisphänotyp haben und eine Mischung aus T_{CM} und T_{EM} , vor allem aber T_{CM} , darstellen. [149, 150]

Einen weiteren interessante These wird von Simonetta et al. diskutiert. [154] Entgegen der Annahme, dass Tregs, die unter anderem durch ihre $CD25$ Expression charakterisiert werden, [56] nur eine geringe Menge $CD127$ exprimieren, [104, 155, 156] beschreiben sie, dass aktivierte Tregs, abhängig von ihrer Lokalisation, eine hohe $CD127$ Expression aufweisen können. Eine hohe $CD127$ Expression würde demnach kein Ausschlusskriterium für die Klassifizierung von T-Zellen als Tregs darstellen. [154] Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den doppeltpositiven T-Zellen auch um Tregs handeln könnte. Zudem zeigten $CD25^+$ Tregs, die $CD127$ hoch exprimieren, ein längeres Überleben im Vergleich zu denen, die $CD127$ gering exprimieren, [154] was dafür spricht, dass die $CD127$ Expression das Treg-Überleben fördert. Zur Überprüfung der Hypothese, dass es sich bei Doppeltpositiven um langlebige Tregs handelt, könnte in

zukünftigen Experimenten das *Signaling* dieser doppelpositiven Zellen untersucht werden. Bislang konnten jedoch noch keine suppressiven Eigenschaften von doppelpositiven T-Zellen im Vergleich zu klassischen Tregs gezeigt werden. [104]

Da CD25 nicht nur als Marker regulatorischer T-Zellen gilt, sondern auch einen Aktivierungsmarker konventioneller T-Zellen darstellt, [103, 104] kann es sich bei den Doppelpositiven jedoch auch um aktivierte konventionelle T-Zellen handeln, was implizieren würde, dass in ghanaischen T1D-PatientInnen eine gesteigerte Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu Kontrollen vorliegt.

Abseits der oben aufgeführten Interpretationen bleibt die Frage bestehen, ob die unterschiedlichen Anteile doppelpositiver bzw. einfachpositiver T-Zellen in PatientInnen und Kontrollen (3.1) auf einer unterschiedlichen Verteilung naiver und Gedächtnis-T-Zellen beruhen, die eine variierende Expression des IL-2- und IL-7-Rezeptors aufweisen. (3.2)

Daher wurden in einem folgenden Analyseschritt die Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen in T1D-PatientInnen und Kontrollen verglichen.

4.1.3 Unterschiedliche Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen in T1D-PatientInnen und Kontrollen

Im Vergleich der Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen von T1D-PatientInnen und Kontrollen zeigten sich unterschiedliche Proportionen dieser in beiden Kohorten. (3.3) In der ghanaischen Kohorte konnte dabei eine signifikant größere Proportion von T_{CM} in T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden. (Abb. 8 A) In der deutschen Kohorte zeigte sich hingegen eine signifikant niedrigere Proportion von T_{EMRA} in T1D-PatientInnen als in Kontrollen. (Abb. 8 B)

Dies bedeutet, dass in ghanaischen T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen eine größere Proportion eines *Memory Subsets* mit hohem Anteil Doppelpositiver vorliegt, wohingegen in der deutschen Kohorte in T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen eine kleinere Proportion des *Memory Subsets* mit dem geringsten Anteil Einfachpositiver vorliegt. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass die unterschiedlichen Anteile von doppelpositiven bzw. einfachpositiven T-Zellen in PatientInnen und Kontrollen

(3.1) auf einer unterschiedlichen Verteilung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen beruhen könnten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit beschrieben Matteucci et al. eine geringere Proportion von T_{CM} und T_N und hingegen eine größere Proportion von T_{EMRA} in T1D-PatientInnen als in Kontrollen. [157] Zu beachten ist, dass dabei $CD4^+/CD26^+$ T-Zellen untersucht wurden, was methodisch von unserem Vorgehen abweicht. Zudem wurde eine deutlich ältere Kohorte untersucht, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt ist.

In einer weiteren Studie zeigte sich – ähnlich zu unseren Befunden – bei PatientInnen mit T1D-Manifestation ($\leq$ sechs Monate nach Manifestation) ein höherer Anteil $CD4^+ T_N$ sowie ein geringerer Anteil $CD4^+ T_{EM}$ und T_{EMRA} im Vergleich zu altersgematchten Kontrollen. Im Unterschied zu dieser Arbeit wurde zur Klassifikation der *Memory Subsets* zusätzlich der Marker CD27 verwendet. Zudem erfolgte die Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt nach Manifestation, während die PatientInnen unserer Studie seit mindestens einem Jahr erkrankt waren. Der Altersdurchschnitt der analysierten Kohorte entsprach dem der hier untersuchten ghanaischen Kohorte. [158]

Zusammenfassend konnte in ghanaischen T1D-PatientInnen eine größere Proportion von T_{CM} gezeigt werden, die einen hohen Anteil Doppeltpositiver aufweisen. In deutschen PatientInnen hingegen wurde eine niedrigere Proportion von T_{EMRA} deutlich, welche den geringsten Anteil Einfachpositiver aufweisen. (3.2-3.3)

Ob die unterschiedlichen Anteile Doppelt- und Einfachpositiver in T1D-PatientInnen und Kontrollen lediglich auf unterschiedlichen Proportionen der *Memory Subsets* beruhen, oder ob auch innerhalb der naiven und Gedächtnis-T-Zellen erkrankungsassoziierte Unterschiede in der IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression bestehen, wurde im folgenden Analyseschritt überprüft. (3.4)

4.1.4 Spezifische *Memory Subsets* zeigen eine unterschiedliche IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression in T1D-PatientInnen und Kontrollen

Auch in spezifischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen konnten in der Analyse der CD25/CD127 Expression Unterschiede zwischen T1D-PatientInnen und Kontrollen aufgezeigt werden. (3.4) In der ghanaischen Kohorte zeigte sich dabei ein signifikant

größerer Anteil von Doppeltpositiven bei T_{EMRA} in T1D-PatientInnen als in Kontrollen. In der deutschen Kohorte war hingegen ein signifikant größerer Anteil von Einfachpositiven bei T_N in T1D-PatientInnen als in Kontrollen zu erkennen. (Abb. 9) Dies bedeutet, dass auch innerhalb einzelner *Memory Subsets*, die in PatientInnen und Kontrollen zu ähnlichen Anteilen vorkommen, erkrankungsspezifische Unterschiede in der Expression der IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Kette zwischen T1D-PatientInnen und Kontrollen bestehen. Die Unterschiede in der CD25/CD127 Expression auf CD4⁺ T-Zellen von T1D-PatientInnen und Kontrollen sind also nicht nur auf unterschiedliche Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen zurückzuführen.

Betrachtet man die Ergebnisse der bereits aufgeführten Analysen, sind zwei erkrankungsspezifische Phänomene zu beobachten. Zum einen zeigt sich in T1D-PatientInnen der ghanaischen Kohorte eine größere Proportion von T_{CM}, die einen hohen Anteil Doppeltpositiver aufweisen, bzw. in T1D-PatientInnen der deutschen Kohorte eine geringere Proportion von T_{EMRA}, die den geringsten Anteil Einfachpositiver aufweisen. Zum anderen zeigt sich auch innerhalb spezifischer naiver und Gedächtnis-T-Zellen, die in T1D-PatientInnen und Kontrollen zu ähnlichen Anteilen vorkommen, in T1D-PatientInnen ein größerer Anteil Doppeltpositiver in der ghanaischen Kohorte bzw. Einfachpositiver in der deutschen Kohorte. Auch hier ist hinsichtlich des Ländervergleichs erneut auf den Altersunterschied beider Kohorten hinzuweisen, der die unterschiedlichen Ergebnisse beeinflusst haben könnte.

4.1.5 Der klinische Phänotyp von T1D-PatientInnen und Kontrollen korreliert mit der Expression der IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Kette

In vorherigen Studien wurde die Relevanz des klinischen Phänotyps von PatientInnen in der Entstehung autoimmuner Erkrankungen, wie auch in der T1D-Pathogenese deutlich. [10, 43, 45, 46, 152] Daher erfolgte abschließend eine Assoziation des Immunphänotyps mit dem klinischen Phänotyp der ProbandInnen. (3.5) Da sich in der Immunphänotypisierung v.a. unterschiedliche Anteile Doppeltpositiver und CD127 Einfachpositiver in PatientInnen und Kontrollen zeigten, lag der Fokus der Korrelationsanalysen auf jenen doppelt- und einfachpositiven T-Zellen.

Dabei zeigte sich in der ghanaischen Kohorte eine positive Korrelation zwischen Doppeltpositiven und den Parametern Alter bei Rekrutierung, Manifestationsalter und

Erkrankungsdauer von T1D-PatientInnen, wohingegen eine negative Korrelation zwischen Doppelpositiven und dem HbA1c ersichtlich wurde. Auch in der deutschen Kohorte zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Doppelpositiven und dem Alter bei Rekrutierung und der Erkrankungsdauer von T1D-PatientInnen. Bei Korrelation Doppelpositiver mit dem HbA1c konnte in der deutschen Kohorte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Dies könnte der geringen Streubreite der HbA1c-Werte in der deutschen Kohorte im Vergleich zur ghanaischen Kohorte geschuldet sein. (Abb. 13) Im Gegensatz dazu ergab sich bei Assoziation der klinischen Parameter mit Einfachpositiven in ghanaischen T1D-PatientInnen eine negative Korrelation mit den Parametern Alter bei Rekrutierung, Manifestationsalter und Erkrankungsdauer sowie eine positive Korrelation mit dem HbA1c.

Somit verhielten sich in ghanaischen T1D-PatientInnen T-Zellen, die sowohl die IL-2- als auch die IL-7-Rezeptor- α -Kette exprimierten, in Bezug auf die klinischen Parameter jeweils entgegengesetzt zu T-Zellen, die nur die IL-7-Rezeptor- α -Kette exprimierten.

Der positive Zusammenhang zwischen Alter und doppelpositiven T-Zellen, konnte auch in einer Studie von Narsale et al. gezeigt werden. Anders als in der vorliegenden Arbeit, in der die Erkrankungsdauer positiv mit doppelpositiven T-Zellen korrelierte, zeigte sich in ihrer Studie nach Manifestation eine Abnahme doppelpositiver T-Zellen. [151]

Das entgegengesetzte Verhalten Doppel- und Einfachpositiver in Bezug auf die klinischen Parameter könnte zudem einen Hinweis auf ihre unterschiedliche Funktion und Rolle im T1D darstellen sowie die aufgeführten Thesen stützen, dass Einfachpositive zu autoreaktiver Effektor-Aktivität in Autoimmunerkrankungen beitragen [143, 146] und Doppelpositive hingegen als antiinflammatorische Zellen mit protektiver Funktion fungieren. (4.1.1) [150]

4.2 Limitationen

Limitierende Faktoren dieser Arbeit waren die unterschiedliche Gruppengröße beider Kohorten sowie der Altersunterschied, mit durchschnittlich höherem Alter der ghanaischen ProbandInnen im Vergleich zu den deutschen ProbandInnen. Vor allem im Alter zwischen 30 und 60 Lebensjahren bestand in der deutschen Kohorte eine geringe ProbandInnenzahl, was zu den unterschiedlichen Ergebnissen beider Kohorten beigetragen und somit den Ländervergleich beeinflusst haben könnte. Auch die geringe Streubreite des HbA1c in der deutschen Kohorte hatte einen Effekt auf die Aussagekraft

der Korrelationsanalyse. In zukünftigen Analysen könnte daher zum Beispiel ein *Matching* der ProbandInnen der ghanaischen und deutschen Kohorte erfolgen, um so eine bessere Aussage über Gemeinsamkeiten und länderspezifische Unterschiede treffen zu können. Zudem war die begrenzte Anzahl an StudienteilnehmerInnen ein limitierender Faktor dieser Arbeit, wodurch das *Matching* von PatientInnen und Kontrollen erschwert wurde und die Aussagekraft der Ergebnisse im Vergleich zu einer größeren Stichprobe eingeschränkt ist.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit konsistent in beiden Kohorten eine vermehrte CD127 Expression auf CD4⁺ T-Zellen von T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen. Dabei war in der ghanaischen Kohorte ein größerer Anteil doppeltpositiver T-Zellen, in der deutschen Kohorte dagegen ein größerer Anteil CD127 einfachpositiver T-Zellen in T1D-PatientInnen als in Kontrollen zu finden. Zusätzlich zeigten sich zwischen T1D-PatientInnen und Kontrollen sowie im Ländervergleich unterschiedliche Proportionen von naiven und Gedächtnis-T-Zellen, die eine unterschiedliche CD25/CD127 Expression aufwiesen. Darüber hinaus konnte auch innerhalb spezifischer *Memory Subsets* in T1D-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollen ein vermehrter Anteil Doppeltpositiver (Ghana) und CD127 Einfachpositiver (Deutschland) nachgewiesen werden. Bei Assoziation doppeltpositiver und einfachpositiver T-Zellen mit klinischen Parametern korrelierten diese in ghanaischen T1D-PatientInnen jeweils entgegengesetzt mit den Parametern Alter bei Rekrutierung, Manifestationsalter, Erkrankungsdauer und HbA1c, was eine unterschiedliche Funktion und Rolle beider T-Zellgruppen im T1D nahelegt. Vor dem Hintergrund vorausgegangener Studien sowie der aufgeführten Analysen wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei doppeltpositiven T-Zellen um antiinflammatorische T-Zellen handelt, die eine protektive Funktion haben. Dahingehend könnten in nachfolgenden Experimenten die suppressiven Eigenschaften der doppeltpositiven T-Zellen genauer untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit dient der Erweiterung des Wissensstandes über die IL-2- und IL-7-Rezeptor- α -Expression auf CD4⁺ T-Zellen von T1D-PatientInnen und gesunden Kontrollen. Diese Informationen können hilfreich für die Weiterentwicklung von IL-2- und IL-7-assoziierten Immuntherapien zur kausalen Behandlung des T1D sein.

5 Literaturverzeichnis

1. Liese, A.D., R.B. D'Agostino, Jr., R.F. Hamman, P.D. Kilgo, J.M. Lawrence, L.L. Liu, B. Loots, B. Linder, S. Marcovina, B. Rodriguez, D. Standiford, and D.E. Williams, *The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study*. Pediatrics, 2006. **118**(4): p. 1510-8DOI: 10.1542/peds.2006-0690.
2. Dabelea, D., R.A. Bell, R.B. D'Agostino, Jr., G. Imperatore, J.M. Johansen, B. Linder, L.L. Liu, B. Loots, S. Marcovina, E.J. Mayer-Davis, D.J. Pettitt, and B. Waitzfelder, *Incidence of diabetes in youth in the United States*. Jama, 2007. **297**(24): p. 2716-24DOI: 10.1001/jama.297.24.2716.
3. Pettitt, D.J., J. Talton, D. Dabelea, J. Divers, G. Imperatore, J.M. Lawrence, A.D. Liese, B. Linder, E.J. Mayer-Davis, C. Pihoker, S.H. Saydah, D.A. Standiford, R.F. Hamman, and S.f.d.i.Y.S. Group, *Prevalence of diabetes in U.S. youth in 2009: the SEARCH for diabetes in youth study*. Diabetes Care, 2014. **37**(2): p. 402-8DOI: 10.2337/dc13-1838.
4. Karvonen, M., M. Viik-Kajander, E. Moltchanova, I. Libman, R. LaPorte, and J. Tuomilehto, *Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. Diabetes Care, 2000. **23**(10): p. 1516-26DOI: 10.2337/diacare.23.10.1516.
5. Rosenbauer, J., A. Icks, and G. Giani, *Incidence and prevalence of childhood type 1 diabetes mellitus in Germany--model-based national estimates*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2002. **15**(9): p. 1497-504DOI: 10.1515/jpem.2002.15.9.1497.
6. Cooper, G.S., M.L. Bynum, and E.C. Somers, *Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases*. J Autoimmun, 2009. **33**(3-4): p. 197-207DOI: 10.1016/j.jaut.2009.09.008.
7. Gregory, G.A., T.I.G. Robinson, S.E. Linklater, F. Wang, S. Colagiuri, C. de Beaufort, K.C. Donaghue, D.J. Magliano, J. Maniam, T.J. Orchard, P. Rai, and G.D. Ogle, *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. 741-760DOI: 10.1016/s2213-8587(22)00218-2.
8. Rosenbauer, J., A. Neu, U. Rothe, J. Seufert, and R.W. Holl, *Diabetestypen sind nicht auf Altersgruppen beschränkt: Typ-1-Diabetes bei Erwachsenen und Typ-2-Diabetes bei Kindern und Jugendlichen*. Journal of Health Monitoring, 2019. **4**(2): p. 31--53DOI: <http://dx.doi.org/10.25646/5981>.
9. Diaz-Valencia, P.A., P. Bougnères, and A.J. Valleron, *Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review*. BMC Public Health, 2015. **15**: p. 255DOI: 10.1186/s12889-015-1591-y.
10. Diamond Project Group, *Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999*. Diabet Med, 2006. **23**(8): p. 857-66DOI: 10.1111/j.1464-5491.2006.01925.x.
11. EURODIAB ACE Study Group, *Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group*. Lancet, 2000. **355**(9207): p. 873-6.
12. Patterson, C.C., G.G. Dahlquist, E. Gyürüs, A. Green, and G. Soltész, *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study*. Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2027-33DOI: 10.1016/s0140-6736(09)60568-7.
13. Gale, E.A., *The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century*. Diabetes, 2002. **51**(12): p. 3353-61DOI: 10.2337/diabetes.51.12.3353.
14. Raicevic, M., M. Samardzic, I. Soldatovic, N. Curovic Popovic, and R. Vukovic, *Trends in nationwide incidence of pediatric type 1 diabetes in Montenegro during the last 30 years*. Front Endocrinol (Lausanne), 2022. **13**: p. 991533DOI: 10.3389/fendo.2022.991533.
15. Balcha, S.A., D.I.W. Phillips, and E.R. Trimble, *Type 1 Diabetes in a Resource-Poor Setting: Malnutrition Related, Malnutrition Modified, or Just Diabetes?* Curr Diab Rep, 2018. **18**(7): p. 47DOI: 10.1007/s11892-018-1003-7.

16. Hall, V., R.W. Thomsen, O. Henriksen, and N. Lohse, *Diabetes in Sub Saharan Africa 1999-2011: epidemiology and public health implications. A systematic review*. BMC Public Health, 2011. **11**: p. 564DOI: 10.1186/1471-2458-11-564.
17. Levitt, N.S., *Diabetes in Africa: epidemiology, management and healthcare challenges*. Heart, 2008. **94**(11): p. 1376-82DOI: 10.1136/hrt.2008.147306.
18. Mayer-Davis, E.J., J.M. Lawrence, D. Dabelea, J. Divers, S. Isom, L. Dolan, G. Imperatore, B. Linder, S. Marcovina, D.J. Pettitt, C. Pihoker, S. Saydah, and L. Wagenknecht, *Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012*. N Engl J Med, 2017. **376**(15): p. 1419-1429DOI: 10.1056/NEJMoa1610187.
19. Dabelea, D., E.J. Mayer-Davis, S. Saydah, G. Imperatore, B. Linder, J. Divers, R. Bell, A. Badaru, J.W. Talton, T. Crume, A.D. Liese, A.T. Merchant, J.M. Lawrence, K. Reynolds, L. Dolan, L.L. Liu, and R.F. Hamman, *Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009*. Jama, 2014. **311**(17): p. 1778-86DOI: 10.1001/jama.2014.3201.
20. Gill, G.V., K.R. Huddle, and G. Monkoe, *Long-term (20 years) outcome and mortality of Type 1 diabetic patients in Soweto, South Africa*. Diabet Med, 2005. **22**(12): p. 1642-6DOI: 10.1111/j.1464-5491.2005.01712.x.
21. Lester, F.T., *Clinical features, complications and mortality in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients in Addis Ababa, Ethiopia, 1976-1990*. Q J Med, 1992. **83**(301): p. 389-99.
22. McLarty, D.G., L. Kinabo, and A.B. Swai, *Diabetes in tropical Africa: a prospective study, 1981-7. II. Course and prognosis*. Bmj, 1990. **300**(6732): p. 1107-10DOI: 10.1136/bmj.300.6732.1107.
23. Libman, I.M., R.E. LaPorte, D. Becker, J.S. Dorman, A.L. Drash, and L. Kuller, *Was there an epidemic of diabetes in nonwhite adolescents in Allegheny County, Pennsylvania?* Diabetes Care, 1998. **21**(8): p. 1278-81DOI: 10.2337/diacare.21.8.1278.
24. Seyfarth, J., O. Sarfo-Kantanka, J. Rosenbauer, R.O. Phillips, and M. Jacobsen, *Type-1 diabetes onset age and sex differences between Ghanaian and German urban populations*. J Diabetes, 2019. **11**(12): p. 1002-1004DOI: 10.1111/1753-0407.12978.
25. Swai, A.B., J. Lutale, and D.G. McLarty, *Diabetes in tropical Africa: a prospective study, 1981-7. I. Characteristics of newly presenting patients in Dar es Salaam, Tanzania, 1981-7*. Bmj, 1990. **300**(6732): p. 1103-6DOI: 10.1136/bmj.300.6732.1103.
26. Kalk, W.J., K.R. Huddle, and F.J. Raal, *The age of onset and sex distribution of insulin-dependent diabetes mellitus in Africans in South Africa*. Postgrad Med J, 1993. **69**(813): p. 552-6DOI: 10.1136/pgmj.69.813.552.
27. Alemu, S., A. Dessie, E. Seid, E. Bard, P.T. Lee, E.R. Trimble, D.I. Phillips, and E.H. Parry, *Insulin-requiring diabetes in rural Ethiopia: should we reopen the case for malnutrition-related diabetes?* Diabetologia, 2009. **52**(9): p. 1842-5DOI: 10.1007/s00125-009-1433-5.
28. Asanghanwa, M., F.K. Gorus, I. Weets, B.V. der Auwera, F. Aminkeng, E. Mbunwe, P. Goubert, K. Verhaeghen, E. Sobngwi, J.M. Wenzlau, J.C. Hutton, D.G. Pipeleers, B. Keymeulen, J.C. Mbanya, and C. van Schravendijk, *Clinical and biological characteristics of diabetic patients under age 40 in Cameroon: relation to autoantibody status and comparison with Belgian patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **103**(1): p. 97-105DOI: 10.1016/j.diabres.2013.11.013.
29. Hussen, H.I., M. Persson, and T. Moradi, *The trends and the risk of type 1 diabetes over the past 40 years: an analysis by birth cohorts and by parental migration background in Sweden*. BMJ Open, 2013. **3**(10): p. e003418DOI: 10.1136/bmjopen-2013-003418.
30. Green, A., E.A. Gale, and C.C. Patterson, *Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study*. Lancet, 1992. **339**(8798): p. 905-9DOI: 10.1016/0140-6736(92)90938-y.
31. Kyvik, K.O., L. Nystrom, F. Gorus, M. Songini, J. Oestman, C. Castell, A. Green, E. Guyrus, C. Ionescu-Tirgoviste, P.A. McKinney, D. Michalkova, R. Ostrauskas, and N.T. Raymond, *The epidemiology of Type 1 diabetes mellitus is not the same in young adults as in children*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 377-384DOI: 10.1007/s00125-004-1331-9.

32. Stahl-Pehe, A., C. Kamrath, N. Prinz, T. Kapellen, U. Menzel, O. Kordonouri, K.O. Schwab, S. Bechtold-Dalla Pozza, J. Rosenbauer, and R.W. Holl, *Prevalence of type 1 and type 2 diabetes in children and adolescents in Germany from 2002 to 2020: A study based on electronic health record data from the DPV registry*. J Diabetes, 2022. **14**(12): p. 840-850DOI: 10.1111/1753-0407.13339.
33. Itoh, N., T. Hanafusa, A. Miyazaki, J. Miyagawa, K. Yamagata, K. Yamamoto, M. Waguri, A. Imagawa, S. Tamura, M. Inada, and et al., *Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2313-22DOI: 10.1172/jci116835.
34. Keenan, H.A., J.K. Sun, J. Levine, A. Doria, L.P. Aiello, G. Eisenbarth, S. Bonner-Weir, and G.L. King, *Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2846-53DOI: 10.2337/db10-0676.
35. Meier, J.J., A. Bhushan, A.E. Butler, R.A. Rizza, and P.C. Butler, *Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?* Diabetologia, 2005. **48**(11): p. 2221-8DOI: 10.1007/s00125-005-1949-2.
36. Imagawa, A., T. Hanafusa, N. Itoh, M. Waguri, K. Yamamoto, J. Miyagawa, M. Moriwaki, K. Yamagata, H. Iwahashi, M. Sada, T. Tsuji, S. Tamura, S. Kawata, M. Kuwajima, H. Nakajima, M. Namba, and Y. Matsuzawa, *Immunological abnormalities in islets at diagnosis paralleled further deterioration of glycaemic control in patients with recent-onset Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*. Diabetologia, 1999. **42**(5): p. 574-8DOI: 10.1007/s001250051197.
37. Moriwaki, M., N. Itoh, J. Miyagawa, K. Yamamoto, A. Imagawa, K. Yamagata, H. Iwahashi, H. Nakajima, M. Namba, S. Nagata, T. Hanafusa, and Y. Matsuzawa, *Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type 1 diabetes mellitus*. Diabetologia, 1999. **42**(11): p. 1332-40DOI: 10.1007/s001250051446.
38. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300DOI: 10.1038/nature08933.
39. Sreenan, S., A.J. Pick, M. Levisetti, A.C. Baldwin, W. Pugh, and K.S. Polonsky, *Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse*. Diabetes, 1999. **48**(5): p. 989-96DOI: 10.2337/diabetes.48.5.989.
40. Dirice, E., S. Kahraman, D.F. De Jesus, A. El Ouaamari, G. Basile, R.L. Baker, B. Yigit, P.D. Piehowski, M.J. Kim, A.J. Dwyer, R.W.S. Ng, C. Schuster, H. Vethe, T. Martinov, Y. Ishikawa, A.K.K. Teo, R.D. Smith, J. Hu, K. Haskins, T. Serwold, W.J. Qian, B.T. Fife, S. Kissler, and R.N. Kulkarni, *Increased beta-cell proliferation before immune cell invasion prevents progression of type 1 diabetes*. Nat Metab, 2019. **1**(5): p. 509-518DOI: 10.1038/s42255-019-0061-8.
41. Chen, Y.C., Y.C. Tung, S.Y. Liu, C.T. Lee, and W.Y. Tsai, *Clinical characteristics of type 1 diabetes mellitus in Taiwanese children aged younger than 6 years: A single-center experience*. J Formos Med Assoc, 2017. **116**(5): p. 340-344DOI: 10.1016/j.jfma.2016.07.005.
42. Achenbach, P., S. Krause, and A.-G. Ziegler, *Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1–Update 2010*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2010. **5**(03): p. R31-R46.
43. Ferrara-Cook, C., S.M. Geyer, C. Evans-Molina, I.M. Libman, D.J. Becker, S.E. Gitelman, M.J. Redondo, and G. Type 1 Diabetes TrialNet Study, *Excess BMI Accelerates Islet Autoimmunity in Older Children and Adolescents*. Diabetes Care, 2020. **43**(3): p. 580-587DOI: 10.2337/dc19-1167.
44. Ferrara, C.T., S.M. Geyer, Y.F. Liu, C. Evans-Molina, I.M. Libman, R. Besser, D.J. Becker, H. Rodriguez, A. Moran, S.E. Gitelman, and M.J. Redondo, *Excess BMI in Childhood: A Modifiable Risk Factor for Type 1 Diabetes Development?* Diabetes Care, 2017. **40**(5): p. 698-701DOI: 10.2337/dc16-2331.
45. Virtanen, S.M., E. Hyppönen, E. Läärä, P. Vähäsalo, P. Kulmala, K. Savola, L. Räsänen, A. Aro, M. Knip, and H.K. Akerblom, *Cow's milk consumption, disease-associated*

- autoantibodies and type 1 diabetes mellitus: a follow-up study in siblings of diabetic children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. Diabet Med*, 1998. **15**(9): p. 730-8DOI: 10.1002/(sici)1096-9136(199809)15:9<730::Aid-dia646>3.0.Co;2-c.
46. Lamb, M.M., X. Yin, K. Barriga, M.R. Hoffman, A.E. Barón, G.S. Eisenbarth, M. Rewers, and J.M. Norris, *Dietary glycemic index, development of islet autoimmunity, and subsequent progression to type 1 diabetes in young children. J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(10): p. 3936-42DOI: 10.1210/jc.2008-0886.
 47. Lamb, M.M., B. Frederiksen, J.A. Seifert, M. Kroehl, M. Rewers, and J.M. Norris, *Sugar intake is associated with progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. Diabetologia*, 2015. **58**(9): p. 2027-34DOI: 10.1007/s00125-015-3657-x.
 48. Knip, M., S.M. Virtanen, K. Seppä, J. Ilonen, E. Savilahti, O. Vaarala, A. Reunanen, K. Teramo, A.M. Hämäläinen, J. Paronen, H.M. Dosch, T. Hakulinen, and H.K. Akerblom, *Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. N Engl J Med*, 2010. **363**(20): p. 1900-8DOI: 10.1056/NEJMoa1004809.
 49. Waukau, J., J. Woodliff, and S. Glisic, *Human in vitro suppression as screening tool for the recognition of an early state of immune imbalance. J Vis Exp*, 2011(53)DOI: 10.3791/3071.
 50. Jailwala, P., J. Waukau, S. Glisic, S. Jana, S. Ehlenbach, M. Hessner, R. Alemzadeh, S. Matsuyama, P. Laud, X. Wang, and S. Ghosh, *Apoptosis of CD4+ CD25(high) T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation. PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6527DOI: 10.1371/journal.pone.0006527.
 51. 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. 146-54DOI: 10.1016/j.clim.2014.02.007.
 52. Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura, *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev*, 2006. **212**: p. 8-27DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.
 53. Wing, K., Z. Fehervari, and S. Sakaguchi, *Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. Int Immunol*, 2006. **18**(7): p. 991-1000DOI: 10.1093/intimm/dxl044.
 54. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
 55. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi, *Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. J Immunol*, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
 56. Malek, T.R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong, *CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. Immunity*, 2002. **17**(2): p. 167-78DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00367-9.
 57. Almeida, A.R., N. Legrand, M. Papiernik, and A.A. Freitas, *Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. J Immunol*, 2002. **169**(9): p. 4850-60DOI: 10.4049/jimmunol.169.9.4850.
 58. Schneider, A., M. Rieck, S. Sanda, C. Pihoker, C. Greenbaum, and J.H. Buckner, *The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 7350-5DOI: 10.4049/jimmunol.181.10.7350.
 59. Long, S.A., K. Cerosaletti, P.L. Bollyky, M. Tatum, H. Shilling, S. Zhang, Z.Y. Zhang, C. Pihoker, S. Sanda, C. Greenbaum, and J.H. Buckner, *Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+)*

- regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects*. Diabetes, 2010. **59**(2): p. 407-15DOI: 10.2337/db09-0694.
60. Kukreja, A., G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli, and N. Maclaren, *Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 131-40DOI: 10.1172/jci13605.
 61. Lindley, S., C.M. Dayan, A. Bishop, B.O. Roep, M. Peakman, and T.I. Tree, *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9DOI: 10.2337/diabetes.54.1.92.
 62. Brusko, T.M., C.H. Wasserfall, M.J. Clare-Salzler, D.A. Schatz, and M.A. Atkinson, *Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1407-14DOI: 10.2337/diabetes.54.5.1407.
 63. Atkinson, M.A., *The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11)DOI: 10.1101/cshperspect.a007641.
 64. Jankovic, D., Z. Liu, and W.C. Gause, *Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways*. Trends Immunol, 2001. **22**(8): p. 450-7DOI: 10.1016/s1471-4906(01)01975-5.
 65. Collier, J.L., S.A. Weiss, K.E. Pauken, D.R. Sen, and A.H. Sharpe, *Not-so-opposite ends of the spectrum: CD8(+) T cell dysfunction across chronic infection, cancer and autoimmunity*. Nat Immunol, 2021. **22**(7): p. 809-819DOI: 10.1038/s41590-021-00949-7.
 66. Sun, L., Y. Su, A. Jiao, X. Wang, and B. Zhang, *T cells in health and disease*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 235DOI: 10.1038/s41392-023-01471-y.
 67. Walter, U. and P. Santamaria, *CD8+ T cells in autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 624-31DOI: 10.1016/j.coi.2005.09.014.
 68. von Herrath, M., S. Sanda, and K. Herold, *Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 988-94DOI: 10.1038/nri2192.
 69. Santamaria, P., *Effector lymphocytes in islet cell autoimmunity*. Rev Endocr Metab Disord, 2003. **4**(3): p. 271-80DOI: 10.1023/a:1025156413404.
 70. Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12DOI: 10.1038/44385.
 71. Raphael, I., R.R. Joern, and T.G. Forsthuber, *Memory CD4(+) T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases*. Cells, 2020. **9**(3)DOI: 10.3390/cells9030531.
 72. 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. 745-63DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
 73. Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F.A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M.R. Boulassel, G. Ghattas, J.M. Brenchley, T.W. Schacker, B.J. Hill, D.C. Douek, J.P. Routy, E.K. Haddad, and R.P. Sékaly, *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 893-900DOI: 10.1038/nm.1972.
 74. Lugli, E., L. Gattinoni, A. Roberto, D. Mavilio, D.A. Price, N.P. Restifo, and M. Roederer, *Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells*. Nat Protoc, 2013. **8**(1): p. 33-42DOI: 10.1038/nprot.2012.143.
 75. Willinger, T., T. Freeman, H. Hasegawa, A.J. McMichael, and M.F. Callan, *Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5895-903DOI: 10.4049/jimmunol.175.9.5895.
 76. Campbell, J.J., K.E. Murphy, E.J. Kunkel, C.E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H.B. Greenberg, M.A. Vierra, S.B. Goodman, M.C. Genovese, A.J. Wardlaw, E.C. Butcher, and L. Wu, *CCR7 expression and memory T cell diversity in humans*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 877-84DOI: 10.4049/jimmunol.166.2.877.
 77. Kaech, S.M. and R. Ahmed, *Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 415-22DOI: 10.1038/87720.

78. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin.* N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34DOI: 10.1056/nejm200010053431407.
79. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52DOI: 10.1038/32588.
80. Debles, G.F., C.N. Arnold, A.J. Young, S. Krautwald, M. Lipp, J.B. Hay, and E.C. Butcher, *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues.* Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 889-94DOI: 10.1038/ni1238.
81. Förster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E. Wolf, and M. Lipp, *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs.* Cell, 1999. **99**(1): p. 23-33DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80059-8.
82. Flynn, J.K. and P.R. Gorry, *Stem memory T cells (TSCM)-their role in cancer and HIV immunotherapies.* Clin Transl Immunology, 2014. **3**(7): p. e20DOI: 10.1038/cti.2014.16.
83. Gattinoni, L. and N.P. Restifo, *Moving T memory stem cells to the clinic.* Blood, 2013. **121**(4): p. 567-8DOI: 10.1182/blood-2012-11-468660.
84. Restifo, N.P., *Big bang theory of stem-like T cells confirmed.* Blood, 2014. **124**(4): p. 476-7DOI: 10.1182/blood-2014-06-578989.
85. Fritsch, R.D., X. Shen, G.P. Sims, K.S. Hathcock, R.J. Hodes, and P.E. Lipsky, *Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27.* J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6489-97DOI: 10.4049/jimmunol.175.10.6489.
86. Fritsch, R.D., X. Shen, G.G. Illei, C.H. Yarboro, C. Prussin, K.S. Hathcock, R.J. Hodes, and P.E. Lipsky, *Abnormal differentiation of memory T cells in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(7): p. 2184-97DOI: 10.1002/art.21943.
87. Cieri, N., B. Camisa, F. Cocchiarella, M. Forcato, G. Oliveira, E. Provasi, A. Bondanza, C. Bordignon, J. Peccatori, F. Ciceri, M.T. Lupo-Stanghellini, F. Mavilio, A. Mondino, S. Bicciato, A. Recchia, and C. Bonini, *IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors.* Blood, 2013. **121**(4): p. 573-84DOI: 10.1182/blood-2012-05-431718.
88. Graef, P., V.R. Buchholz, C. Stemmerger, M. Flossdorf, L. Henkel, M. Schiemann, I. Drexler, T. Höfer, S.R. Riddell, and D.H. Busch, *Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells.* Immunity, 2014. **41**(1): p. 116-26DOI: 10.1016/j.immuni.2014.05.018.
89. Wang, A., S. Chandran, S.A. Shah, Y. Chiu, B.C. Paria, T. Aghamolla, M.M. Alvarez-Downing, C.C. Lee, S. Singh, T. Li, M.E. Dudley, N.P. Restifo, S.A. Rosenberg, and U.S. Kammula, *The stoichiometric production of IL-2 and IFN-gamma mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans.* Sci Transl Med, 2012. **4**(149): p. 149ra120DOI: 10.1126/scitranslmed.3004306.
90. Zhang, X., X. Chang Li, X. Xiao, R. Sun, Z. Tian, and H. Wei, *CD4(+)CD62L(+) central memory T cells can be converted to Foxp3(+) T cells.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77322DOI: 10.1371/journal.pone.0077322.
91. Reinke, S., S. Geissler, W.R. Taylor, K. Schmidt-Bleek, K. Juelke, V. Schwachmeyer, M. Dahne, T. Hartwig, L. Akyuz, C. Meisel, N. Unterwalder, N.B. Singh, P. Reinke, N.P. Haas, H.D. Volk, and G.N. Duda, *Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans.* Sci Transl Med, 2013. **5**(177): p. 177ra36DOI: 10.1126/scitranslmed.3004754.
92. Nielsen, B.R., R. Ratzer, L. Börnsen, M.R. von Essen, J.R. Christensen, and F. Sellebjerg, *Characterization of naïve, memory and effector T cells in progressive multiple sclerosis.* J Neuroimmunol, 2017. **310**: p. 17-25DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.06.001.
93. McKeever, U., J.P. Mordes, D.L. Greiner, M.C. Appel, J. Rozing, E.S. Handler, and A.A. Rossini, *Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7618-22DOI: 10.1073/pnas.87.19.7618.
94. Pender, M.P., P.A. Csurhes, C.M. Pfluger, and S.R. Burrows, *Deficiency of CD8+ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis.* Mult Scler, 2014. **20**(14): p. 1825-32DOI: 10.1177/1352458514536252.

95. Stauber, D.J., E.W. Debler, P.A. Horton, K.A. Smith, and I.A. Wilson, *Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2788-93DOI: 10.1073/pnas.0511161103.
96. Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard, *New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 480-90DOI: 10.1038/nri2580.
97. Leonard, W.J., J.M. Depper, G.R. Crabtree, S. Rudikoff, J. Pumphrey, R.J. Robb, M. Kronke, P.B. Svetlik, N.J. Pfeffer, T.A. Waldmann, and et al., *Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor*. Nature, 1984. **311**(5987): p. 626-31DOI: 10.1038/311626a0.
98. Nikaido, T. and A. Shimizu, *Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor*. Nature Journal, 1984.
99. Takeshita, T., H. Asao, J. Suzuki, and K. Sugamura, *An associated molecule, p64, with high-affinity interleukin 2 receptor*. Int Immunol, 1990. **2**(5): p. 477-80DOI: 10.1093/intimm/2.5.477.
100. Takeshita, T., H. Asao, K. Ohtani, N. Ishii, S. Kumaki, N. Tanaka, H. Munakata, M. Nakamura, and K. Sugamura, *Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor*. Science, 1992. **257**(5068): p. 379-82DOI: 10.1126/science.1631559.
101. Saito, Y., H. Tada, H. Sabe, and T. Honjo, *Biochemical evidence for a third chain of the interleukin-2 receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(33): p. 22186-91.
102. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi, *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 723-35DOI: 10.1084/jem.20041982.
103. Li, Y., X. Li, X. Geng, and H. Zhao, *The IL-2A receptor pathway and its role in lymphocyte differentiation and function*. Cytokine Growth Factor Rev, 2022. **67**: p. 66-79DOI: 10.1016/j.cytogfr.2022.06.004.
104. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth, *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700DOI: 10.1084/jem.20060468.
105. Cantrell, D.A. and K.A. Smith, *The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model*. Science, 1984. **224**(4655): p. 1312-6DOI: 10.1126/science.6427923.
106. Bayer, A.L., A. Yu, D. Adeegbe, and T.R. Malek, *Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 769-77DOI: 10.1084/jem.20041179.
107. Papiernik, M., M.L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Pénit, *Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency*. Int Immunol, 1998. **10**(4): p. 371-8DOI: 10.1093/intimm/10.4.371.
108. Hulme, M.A., C.H. Wasserfall, M.A. Atkinson, and T.M. Brusko, *Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(1): p. 14-22DOI: 10.2337/db11-1213.
109. Papiernik, M., M. do Carmo Leite-de-Moraes, C. Pontoux, A.M. Joret, B. Rocha, C. Penit, and M. Dy, *T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4642-53.
110. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96DOI: 10.1084/jem.188.2.287.
111. Klebb, G., I.B. Autenrieth, H. Haber, E. Gillert, B. Sadlack, K.A. Smith, and I. Horak, *Interleukin-2 is indispensable for development of immunological self-tolerance*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **81**(3): p. 282-6DOI: 10.1006/clin.1996.0190.
112. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 191-7DOI: 10.1038/ni1428.

113. Suri-Payer, E., A.Z. Amar, A.M. Thornton, and E.M. Shevach, *CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1212-8.
114. Feinerman, O., G. Jentsch, K.E. Tkach, J.W. Coward, M.M. Hathorn, M.W. Sneddon, T. Emonet, K.A. Smith, and G. Altan-Bonnet, *Single-cell quantification of IL-2 response by effector and regulatory T cells reveals critical plasticity in immune response*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 437DOI: 10.1038/msb.2010.90.
115. Willerford, D.M., J. Chen, J.A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F.W. Alt, *Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 521-30DOI: 10.1016/1074-7613(95)90180-9.
116. Sadlack, B., J. Löhler, H. Schorle, G. Klebb, H. Haber, E. Sickel, R.J. Noelle, and I. Horak, *Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4⁺ T cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(11): p. 3053-9DOI: 10.1002/eji.1830251111.
117. Aoki, C.A., C.M. Roifman, Z.X. Lian, C.L. Bowlus, G.L. Norman, Y. Shoenfeld, I.R. Mackay, and M.E. Gershwin, *IL-2 receptor alpha deficiency and features of primary biliary cirrhosis*. J Autoimmun, 2006. **27**(1): p. 50-3DOI: 10.1016/j.jaut.2006.04.005.
118. Cerosaletti, K., A. Schneider, K. Schwedhelm, I. Frank, M. Tatum, S. Wei, E. Whalen, C. Greenbaum, M. Kita, J. Buckner, and S.A. Long, *Multiple autoimmune-associated variants confer decreased IL-2R signaling in CD4⁺ CD25(hi) T cells of type 1 diabetic and multiple sclerosis patients*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83811DOI: 10.1371/journal.pone.0083811.
119. Hirakawa, M., T.R. Matos, H. Liu, J. Koreth, H.T. Kim, N.E. Paul, K. Murase, J. Whangbo, A.C. Alho, S. Nikiforow, C. Cutler, V.T. Ho, P. Armand, E.P. Alyea, J.H. Antin, B.R. Blazar, J.F. Lacerda, R.J. Soiffer, and J. Ritz, *Low-dose IL-2 selectively activates subsets of CD4(+) Tregs and NK cells*. JCI Insight, 2016. **1**(18): p. e89278DOI: 10.1172/jci.insight.89278.
120. Koreth, J., K. Matsuoka, H.T. Kim, S.M. McDonough, B. Bindra, E.P. Alyea, 3rd, P. Armand, C. Cutler, V.T. Ho, N.S. Treister, D.C. Biefang, S. Prasad, D. Tzachanis, R.M. Joyce, D.E. Avigan, J.H. Antin, J. Ritz, and R.J. Soiffer, *Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(22): p. 2055-66DOI: 10.1056/NEJMoa1108188.
121. Hartemann, A., G. Bensimon, C.A. Payan, S. Jacqueminet, O. Bourron, N. Nicolas, M. Fonfrede, M. Rosenzweig, C. Bernard, and D. Klatzmann, *Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase I/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2013. **1**(4): p. 295-305DOI: 10.1016/s2213-8587(13)70113-x.
122. Rosenzweig, M., R. Salet, R. Lorenzon, N. Tchitchek, A. Roux, C. Bernard, J.C. Carel, C. Storey, M. Polak, J. Beltrand, C. Amouyal, A. Hartemann, P. Corbeau, E. Vicaut, C. Bibal, P. Bougnères, T.A. Tran, and D. Klatzmann, *Low-dose IL-2 in children with recently diagnosed type 1 diabetes: a Phase I/II randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study*. Diabetologia, 2020. **63**(9): p. 1808-1821DOI: 10.1007/s00125-020-05200-w.
123. Zhang, R., Y. Zhao, X. Chen, Z. Zhuang, X. Li, and E. Shen, *Low-dose IL-2 therapy in autoimmune diseases: An update review*. Int Rev Immunol, 2024. **43**(3): p. 113-137DOI: 10.1080/08830185.2023.2274574.
124. Zhou, P., *Emerging mechanisms and applications of low-dose IL-2 therapy in autoimmunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2022. **67**: p. 80-88DOI: 10.1016/j.cytogfr.2022.06.003.
125. McElroy, C.A., P.J. Holland, P. Zhao, J.M. Lim, L. Wells, E. Eisenstein, and S.T. Walsh, *Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2503-8DOI: 10.1073/pnas.1116582109.
126. Noguchi, M., Y. Nakamura, S.M. Russell, S.F. Ziegler, M. Tsang, X. Cao, and W.J. Leonard, *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1877-80DOI: 10.1126/science.8266077.

127. Sheikh, A. and N. Abraham, *Interleukin-7 Receptor Alpha in Innate Lymphoid Cells: More Than a Marker*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2897DOI: 10.3389/fimmu.2019.02897.
128. Giri, J.G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L.S. Park, D. Cosman, and D. Anderson, *Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15*. Embo j, 1994. **13**(12): p. 2822-30DOI: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06576.x.
129. Noguchi, M., S. Adelstein, X. Cao, and W.J. Leonard, *Characterization of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(18): p. 13601-13608DOI: 10.1016/s0021-9258(19)38691-0.
130. Leonard, W.J., M. Noguchi, S.M. Russell, and O.W. McBride, *The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of the interleukin-2 receptor gamma chain as a common gamma chain, gamma c*. Immunol Rev, 1994. **138**: p. 61-86DOI: 10.1111/j.1600-065x.1994.tb00847.x.
131. 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. 1584-1593DOI: 10.1038/s41590-019-0479-x.
132. Kondrack, R.M., J. Harbertson, J.T. Tan, M.E. McBreen, C.D. Surh, and L.M. Bradley, *Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1797-806DOI: 10.1084/jem.20030735.
133. Murphy, K. and C. Weaver, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Janeway Immunologie*. 2018. p. 443-515.
134. Read, K.A., M.D. Powell, P.W. McDonald, and K.J. Oestreich, *IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4(+) T helper cell differentiation*. Exp Hematol, 2016. **44**(9): p. 799-808DOI: 10.1016/j.exphem.2016.06.003.
135. Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrançois, *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32DOI: 10.1038/80868.
136. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54DOI: 10.1038/nri2023.
137. Laouar, Y., I.N. Crispe, and R.A. Flavell, *Overexpression of IL-7R alpha provides a competitive advantage during early T-cell development*. Blood, 2004. **103**(6): p. 1985-94DOI: 10.1182/blood-2003-06-2126.
138. Yamazaki, M., T. Yajima, M. Tanabe, K. Fukui, E. Okada, R. Okamoto, S. Oshima, T. Nakamura, T. Kanai, M. Uehira, T. Takeuchi, H. Ishikawa, T. Hibi, and M. Watanabe, *Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis*. J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1556-63DOI: 10.4049/jimmunol.171.3.1556.
139. Rich, B.E., J. Campos-Torres, R.I. Tepper, R.W. Moreadith, and P. Leder, *Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 305-16DOI: 10.1084/jem.177.2.305.
140. Fisher, A.G., C. Burdet, C. Bunce, M. Merkenschlager, and R. Ceredig, *Lymphoproliferative disorders in IL-7 transgenic mice: expansion of immature B cells which retain macrophage potential*. Int Immunol, 1995. **7**(3): p. 415-23DOI: 10.1093/intimm/7.3.415.
141. Deshpande, P., M.M. Cavanagh, S. Le Saux, K. Singh, C.M. Weyand, and J.J. Goronzy, *IL-7- and IL-15-mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1416-23DOI: 10.4049/jimmunol.1201620.
142. Pellegrini, M., T. Calzascia, A.R. Elford, A. Shahinian, A.E. Lin, D. Dissanayake, S. Dhanji, L.T. Nguyen, M.A. Gronski, M. Morre, B. Assouline, K. Lahl, T. Sparwasser, P.S. Ohashi, and T.W. Mak, *Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 528-36DOI: 10.1038/nm.1953.
143. Pellegrini, M., T. Calzascia, J.G. Toe, S.P. Preston, A.E. Lin, A.R. Elford, A. Shahinian, P.A. Lang, K.S. Lang, M. Morre, B. Assouline, K. Lahl, T. Sparwasser, T.F. Tedder, J.H. Paik, R.A. DePinho, S. Basta, P.S. Ohashi, and T.W. Mak, *IL-7 engages multiple*

- mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology.* Cell, 2011. **144**(4): p. 601-13DOI: 10.1016/j.cell.2011.01.011.
144. Seyfarth, J., K. Fortsch, H. Ahlert, H.J. Laws, B. Karges, R. Deenen, K. Kohrer, E. Mayatepek, T. Meissner, and M. Jacobsen, *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. 630-639DOI: 10.1038/icb.2017.24.
 145. Seyfarth, J., N. Mutze, J. Antony Cruz, S. Kummer, C. Reinauer, E. Mayatepek, T. Meissner, and M. Jacobsen, *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. 820DOI: 10.3389/fimmu.2019.00820.
 146. Penaranda, C., W. Kuswanto, J. Hofmann, R. Kenefeck, P. Narendran, L.S. Walker, J.A. Bluestone, A.K. Abbas, and H. Dooks, *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. 12668-73DOI: 10.1073/pnas.1203692109.
 147. Corallo, F., I. Baccelli, L. Belarif, G. Teppaz, M. Caroline, C. Fromond, I. Girault, S. Pengam, E. Soma, F. Sa, J.-P. Conduzorgues, D. Costantini, and N. Poirier, *P721 Treatment of Ulcerative Colitis with OSE-127 (lusvertikimab), a Strict IL-7Ra Antagonist, Non-Cytotoxic Monoclonal Antibody.* Journal of Crohn's and Colitis, 2023. **17**(Supplement_1): p. i851-i852DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjac190.0851.
 148. Poirier, N., I. Baccelli, L. Belarif, R. Abes, G. Teppaz, C. Mary, S. Poli, C. Fromond, I. Girault, S. Pengam, E. Soma, F. De Sa, J.P. Conduzorgues, C. Braudeau, R. Josien, B. Volckaert, D. Costantini, and F. Corallo, *First-in-Human Study in Healthy Subjects with the Noncytotoxic Monoclonal Antibody OSE-127, a Strict Antagonist of IL-7Ralpha.* J Immunol, 2023. **210**(6): p. 753-763DOI: 10.4049/jimmunol.2200635.
 149. Moya, R., H.K. Robertson, D. Payne, A. Narsale, J. Koziol, G. Type 1 Diabetes TrialNet Study, and J.D. Davies, *A pilot study showing associations between frequency of CD4(+) memory cell subsets at diagnosis and duration of partial remission in type 1 diabetes.* Clin Immunol, 2016. **166-167**: p. 72-80DOI: 10.1016/j.clim.2016.04.012.
 150. Narsale, A., R. Moya, and J.D. Davies, *Human CD4(+) CD25(+) CD127(hi) cells and the Th1/Th2 phenotype.* Clin Immunol, 2018. **188**: p. 103-112DOI: 10.1016/j.clim.2018.01.003.
 151. Narsale, A., B. Lam, R. Moya, T. Lu, A. Mandelli, I. Gotuzzo, B. Pessina, G. Giamporcaro, R. Geoffrey, K. Buchanan, M. Harris, A.S. Bergot, R. Thomas, M.J. Hessner, M. Battaglia, E. Serti, and J.D. Davies, *CD4+CD25+CD127hi cell frequency predicts disease progression in type 1 diabetes.* JCI Insight, 2021. **6**(2)DOI: 10.1172/jci.insight.136114.
 152. Dost, A., A. Herbst, K. Kintzel, H. Haberland, C.L. Roth, L. Gortner, and R.W. Holl, *Shorter remission period in young versus older children with diabetes mellitus type 1.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2007. **115**(1): p. 33-7DOI: 10.1055/s-2007-948214.
 153. Narsale, A., R. Moya, H.K. Robertson, and J.D. Davies, *Data on correlations between T cell subset frequencies and length of partial remission in type 1 diabetes.* Data Brief, 2016. **8**: p. 1348-51DOI: 10.1016/j.dib.2016.07.059.
 154. Simonetta, F., A. Chiali, C. Cordier, A. Urrutia, I. Girault, S. Bloquet, C. Tanchot, and C. Bourgeois, *Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells.* Eur J Immunol, 2010. **40**(9): p. 2528-38DOI: 10.1002/eji.201040531.
 155. Cozzo, C., J. Larkin, 3rd, and A.J. Caton, *Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells.* J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5678-82DOI: 10.4049/jimmunol.171.11.5678.
 156. Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A. Bluestone, *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells.* J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11DOI: 10.1084/jem.20060772.
 157. Matteucci, E., M. Ghimenti, S. Di Beo, and O. Giampietro, *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. 977-84DOI: 10.1007/s10875-011-9573-z.
158. Teniente-Serra, A., E. Pizarro, B. Quirant-Sanchez, M.A. Fernandez, M. Vives-Pi, and E.M. Martinez-Caceres, *Identifying Changes in Peripheral Lymphocyte Subpopulations in Adult Onset Type 1 Diabetes*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 784110DOI: 10.3389/fimmu.2021.784110.

6 Anhang

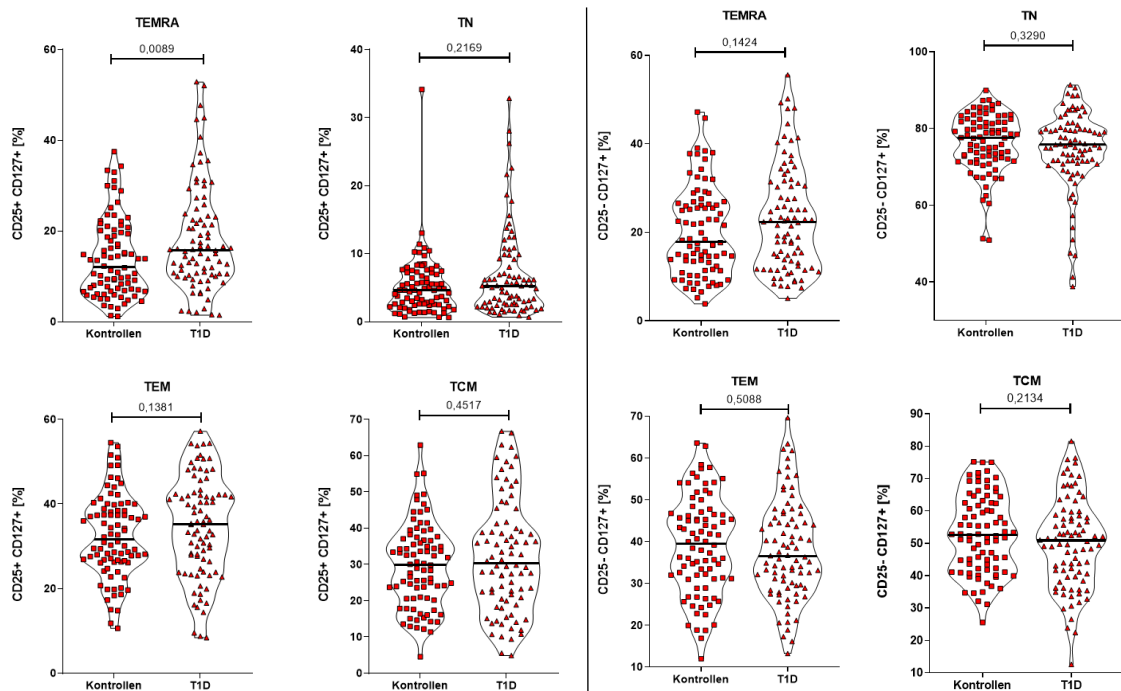


Abb. 14 - Anteile von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen [%] in der ghanaischen Kohorte.

Gezeigt werden die Anteile von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen (%) von T1D-PatientInnen und Kontrollen der ghanaischen Kohorte (rot). Im Rahmen der Auswertung der durchflusszytometrisch gemessenen Zellen wurden die zuvor definierten naiven und Gedächtniszellen auf die Marker CD25 und CD127 *gegatet*. Links der Trennlinie werden die Anteile von CD25+/CD127+ und rechts der Trennlinie die Anteile von CD25-/CD127+ auf CD45RA+CCR7- „TEMRA“, CD45RA+CCR7+ „TN“, CD45RA-CCR7- „TEM“ und CD45RA-CCR7+ „TCM“ dargestellt. Das linke Violinendiagramm repräsentiert jeweils die Kontrollgruppe „Kontrollen“ (Vierecke, n=84), das rechte Violinendiagramm die PatientInnengruppe „T1D“ (Dreiecke, n=84). Die schwarzen Querbalken kennzeichnen den Median. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Exakte p-Werte sind als Dezimalzahlen angegeben.

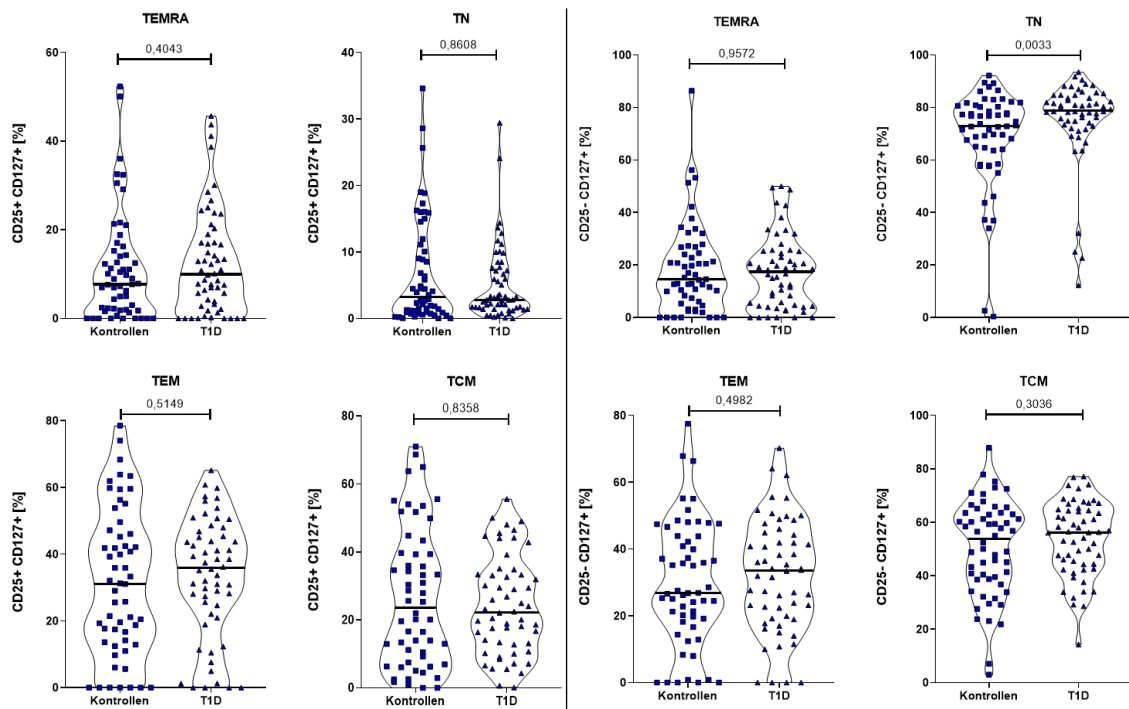


Abb. 15 - Anteile von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen [%] in der deutschen Kohorte.

Gezeigt werden die Anteile von CD25+/CD127+ und CD25-/CD127+ auf naiven und Gedächtnis-T-Zellen (%) von T1D-PatientInnen und Kontrollen der deutschen Kohorte (blau). Im Rahmen der Auswertung der durchflusszytometrisch gemessenen Zellen wurden die zuvor definierten naiven und Gedächtniszellen auf die Marker CD25 und CD127 *gegate*. Links der Trennlinie werden die Anteile von CD25+/CD127+ und rechts der Trennlinie die Anteile von CD25-/CD127+ auf CD45RA+CCR7- „TEMRA“, CD45RA+CCR7+ „TN“, CD45RA-CCR7- „TEM“ und CD45RA-CCR7+ „TCM“ dargestellt. Das linke Violinendiagramm repräsentiert jeweils die Kontrollgruppe „Kontrollen“ (Vierecke, n=56), das rechte Violinendiagramm die PatientInnengruppe „T1D“ (Dreiecke, n=56). Die schwarzen Querbalken kennzeichnen den Median. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Exakte p-Werte sind als Dezimalzahlen angegeben.

7 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. med. Julia Seyfarth und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Marc Jacobsen für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die umfassende Betreuung meiner Arbeit, während und nach meiner Zeit im Labor.

Ich danke Frau PD Dr. rer. nat. Doreen M. Floß für das begleitende Engagement als Co-Betreuerin und die Funktion als Prüfungsmitglied für die anschließende Disputation.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek und allen ÄrztInnen und KinderkrankenpflegerInnen der Diabetes-Ambulanz sowie der Station KK02 für ihre Unterstützung meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt ebenfalls allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Jacobsen, vor allem Wilfred Aniagyei und Ju-Young Kim, für die herzliche, inspirierende und humorvolle Atmosphäre und ihren positiven Einfluss auf meine Arbeit.

Ich danke meiner Familie, meinen Eltern und meinen vier Brüdern, meinem Partner Marc sowie meinen FreundInnen, vor allem Julia, Lena, Lisa und Marie, die mir stets unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Zuletzt danke ich meinem Hebräisch-Lehrer, Herrn Ulrich Berzbach, für die motivierende und inspirierende Begleitung meiner fachlichen und persönlichen Entwicklung, auch über den Unterricht hinaus.