

Der Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Funktion und Differenzierung dendritischer Zellen während des Typ 1 Diabetes mellitus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Melanie Nehring

aus Bergisch Gladbach

Dezember 2023

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Chirurgische Forschung der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefanie Flohé
2. Gutachter: PD Dr. Kathrin Sutter

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2024

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/81932
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240513-100833-2

Alle Rechte vorbehalten.

„Gib das, was dir wichtig ist, nicht auf, nur weil es nicht einfach ist.“

(Albert Einstein)

Für Fabian Höver

Inhalt

1. Einleitung	8
1.1 Das Immunsystem.....	8
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	8
1.1.1.1 Dendritische Zellen - ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität	9
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	11
1.1.2.1 T-Zellen.....	12
1.2 Diabetes mellitus	14
1.2.1 Formen des Diabetes mellitus	14
1.2.2 Folgen des Diabetes mellitus	15
1.2.3 T1DM - eine Autoimmunerkrankung.....	15
1.3 Sepsis	16
1.3.1 Die Definition der Sepsis	16
1.3.2 Zelluläre und molekulare Veränderungen während einer Sepsis.....	17
1.3.3 Der Einfluss des T1DM auf die Sepsis	18
2. Zielsetzung der Arbeit	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Mausstämme.....	21
3.1.2 Medien, Puffer und andere Reagenzien	21
3.1.2.1 Zellkulturmedien.....	21
3.1.2.2 Serum	22
3.1.2.3 Reagenzien.....	22
3.1.2.4 Puffer und Lösungen.....	23
3.1.3 Kommerzielle Reaktionssysteme und Reagenziensätze	23
3.1.4 Antikörper.....	24
3.1.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
3.1.6 Geräte.....	25

3.1.7	Software.....	25
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	Low-Dose Streptozotocin Modell zur Induktion von Typ 1 Diabetes bei Mäusen.....	26
3.2.2	Zökale Ligation und Punktion als murines Modell der polymikrobiellen Sepsis.....	27
3.2.3	CD8 ⁺ T-Zell Transfer von NMRI-Wildtyp in NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse.....	28
3.2.4	Organentnahme und Präparation der Zellen.....	29
3.2.4.1	Peritoneallavage und Isolierung der Peritonealzellen.....	29
3.2.4.2	Bestimmung der bakteriellen Belastung in der Peritoneallavage.....	29
3.2.4.3	Isolierung der Milzzellen.....	29
3.2.4.4	Isolierung der Knochenmarkzellen.....	30
3.2.5	Zellkultur.....	30
3.2.5.1	Generierung von BMDC.....	30
3.2.5.2	<i>In vitro</i> Stimulation der BMDC.....	30
3.2.5.3	Isolation der DC aus der Milz.....	31
3.2.5.4	<i>In vitro</i> Stimulation der Milz-DC.....	31
3.2.5.5	Isolierung der CD4 ⁺ oder CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz.....	31
3.2.5.6	Kokultur naiver BMDC mit T-Zellen diabetischer oder nicht- diabetischer Tiere.....	31
3.2.5.7	Stimulation der Milzzellen mit Peptiden der Glutamat-Decarboxylase.....	32
3.2.5.8	Stimulation der Milzzellen mit PMA und Ionomycin.....	32
3.2.5.9	Analyse der IFN- γ Produktion der Milzzellen ohne vorherige Stimulation.....	32
3.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.6.1	Nachweis verschiedener Zytokine und Chemokine mittels Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA).....	33
3.2.6.2	Nachweis verschiedener Zytokine mittels Zytometrischem Bead Array (CBA).....	33
3.2.7	Durchflusszytometrie.....	33
3.2.7.1	Extrazelluläre Fluoreszenz-Färbung.....	33
3.2.7.2	Intrazelluläre Fluoreszenz-Färbung.....	34

4. Ergebnisse	35
4.1 Etablierung des Modells des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus.....	35
4.2 Einfluss des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus im CLP- Modell.....	
der Sepsis	37
4.2.1 Einfluss des T1DM auf die Induktion der Sepsis.....	37
4.2.2 Einfluss des T1DM auf die Differenzierung der dendritischen Zellen.....	
während der Sepsis.....	38
4.3 Auswirkungen des T1DM auf die Zytokinproduktion <i>de novo</i>	
generierter dendritischer Zellen	40
4.4 Auswirkungen des T1DM auf die dendritischen Zellen in der Milz	40
4.5 Einfluss der T-Zellen diabetischer Tiere auf <i>naive</i> dendritische Zellen <i>in vitro</i>	42
4.6 Einfluss der CD8 ⁺ T-Zellen diabetischer Tiere auf die Differenzierung	
dendritischer Zellen <i>in vivo</i> - das NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> - Transfermodell	44
4.6.1 Charakterisierung der T-Zellen während des T1DM in den	
NMRI-Spendertieren	45
4.6.1.1 Verteilung CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in Milz und Knochenmark	45
4.6.1.2 Analyse der CD25 Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	46
4.6.1.3 Analyse der T-Zell-Subpopulationen in Milz und Knochenmark.....	
der diabetischen Tiere.....	48
4.6.1.4 Analyse der IFN- γ Expression der T-Zellen bei T1DM.....	51
4.6.2 Charakterisierung der dendritischen Zellen während des T1DM in den.....	
NMRI-Spendertieren	53
4.6.2.1 Analyse der DC-Subpopulationen in der Milz während T1DM	53
4.6.2.2 Analyse des Aktivierungszustandes der DC in der Milz bei T1DM.....	54
4.6.2.3 Analyse des Aktivierungszustandes der BMDC bei T1DM	55
4.6.3 Transfer naiver CD8 ⁺ T-Zellen zur Etablierung des Transferexperiments	57
4.6.4 Analyse der Auswirkungen des CD8 ⁺ T-Zell-Transfers im Empfängertier	59
4.6.4.1 Auswirkung des CD8 ⁺ T-Zell-Transfers diabetischer und nicht.....	
diabetischer Tiere auf die Granulozyten im Knochenmark der.....	
NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse	59
4.6.4.2 Charakterisierung der transferierten CD8 ⁺ T-Zellen aus diabetischen	
und nicht diabetischen Tieren nach Transfer in NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse	60

4.6.4.3	Analyse der DC-Subpopulationen in der Milz der NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer	63
4.6.4.4	Analyse des Aktivierungszustandes der DC in der Milz der NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer	64
4.6.4.5	Analyse des Zytokinprofils der DC aus der Milz der NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer	65
4.6.4.6	Analyse des Aktivierungszustandes neu generierter BMDC der NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse nach CD8 ⁺ T-Zell Transfer	67
4.6.4.7	Zytokinprofil der BMDC der NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer	68
5.	Diskussion	70
5.1	Das Low-Dose Streptozotocin Modell des T1DM	70
5.2	T1DM verstärkt die Immunsuppression während einer Sepsis	71
5.3	DC diabetischer Tiere zeigen <i>ex vivo</i> einen dysfunktionalen Phänotyp	72
5.4	Charakterisierung der T-Zellen diabetischer NMRI-Mäuse	74
5.4.1	Anstieg CD8 ⁺ T-Zellen im Knochenmark diabetischer Tiere	74
5.4.2	CD8 ⁺ T-Zellen diabetischer Tiere zeigen erhöhte IFN- γ Expression <i>ex vivo</i>	75
5.5	CD8 ⁺ T-Zellen diabetischer Tiere beeinflussen die Funktion bereits differenzierter DC <i>in vitro</i>	76
5.6	Einfluss CD8 ⁺ T-Zellen auf die Funktion und Differenzierung dendritischer Zellen <i>in vivo</i>	77
6.	Zusammenfassung	82
	Abstract	83
7.	Literaturverzeichnis	84
8.	Anhang	89
8.1	Abkürzungsverzeichnis	89
8.2	Abbildungsverzeichnis	92
8.3	Tabellenverzeichnis	94
8.4	Danksagung	95
8.5	Lebenslauf	96
8.6	Erklärungen	98

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Um den Organismus vor verschiedensten Pathogenen und durch sie verursachten Schäden zu schützen, hat sich im Laufe der Evolution ein komplexes Netzwerk aus physikalischen, chemischen und zellulären Mechanismen entwickelt. Sie verhindern nicht nur das Eindringen und Ausbreiten von Krankheitserregern, sondern sorgen durch die Beseitigung krankhafter Zellveränderungen auch dafür, dass die Integrität des Organismus erhalten bleibt.

Den ersten Abwehrmechanismus gegen Pathogene bilden dabei die zahlreichen chemischen und physikalischen Barrieren des Körpers, wie z.B. das saure Milieu des Magens und die Epithelien mit antimikrobiellen Proteinen (Defensine) [33].

Werden diese Barrieren jedoch von den Krankheitserregern überwunden und gelingt es ihnen in das Gewebe vorzudringen, so kommt es zur Aktivierung komplexer zellulärer Abwehrmechanismen. Dabei werden zwei Arten der Immunantwort unterschieden. Die angeborene Immunantwort ist die erste Reaktion des Körpers auf Pathogene. Sie setzt unmittelbar nach der Infektion ein und ist eher unspezifisch. Mit etwas Verzögerung setzt dann die adaptive Immunantwort ein. Sie richtet sich ganz gezielt gegen bestimmte Pathogene und ist in ihrer Wirkung wesentlich stärker als die angeborene Immunantwort. Die adaptive Immunantwort bildet außerdem die Grundlage für das immunologische Gedächtnis, das heißt der Organismus entwickelt nach der erfolgreichen Bekämpfung eines Erregers eine gewisse Immunität gegen diesen Erreger, wodurch er diesen bei einer erneuten Infektion schneller erkennt und die Immunantwort direkter und stärker ausfällt als bei dem ersten Kontakt [3].

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zur angeborenen Immunität gehören neben dem Komplementsystem eine Vielzahl von Zellen, die an einer ersten unspezifischen Immunantwort beteiligt sind. Zu ihnen zählen neben den phagozytierenden Zellen wie den Makrophagen, den Monozyten, den Granulozyten und den dendritischen Zellen (DC) auch die Mastzellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [71].

Dabei sind es meist die langlebigen Makrophagen, die eingedrungene Erreger als erstes erkennen, da sie in allen Geweben vorkommen. Sie nehmen die Erreger durch Phagozytose auf und töten sie ab. Außerdem tragen sie durch das Freisetzen von Mediatoren wie den Zytokinen dazu bei, dass es zu einer Entzündungsreaktion und somit zu einer Ausweitung der Immunantwort kommt [48, 104].

Im Gegensatz zu den Makrophagen kommen die kurzlebigen Granulozyten im gesunden Gewebe kaum vor. Erst wenn es zu einer Infektion kommt, werden sie vermehrt im Knochenmark gebildet und wandern dann zum Entzündungsherd, wo sie ebenfalls an der Beseitigung der eingedrungenen Erreger beteiligt sind [16].

Eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunabwehr spielen zudem die dendritischen Zellen, da sie auch eine wichtige Verbindung zur adaptiven Immunantwort darstellen. So nehmen sie im Gegensatz zu den Granulozyten und Makrophagen, die Erreger nicht nur auf und zerstören sie, sondern präsentieren die beim Abbau entstandenen Peptidfragmente anschließend den T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen [41].

Doch um Pathogene erkennen und eliminieren zu können, müssen diese zunächst als körperfremd erkannt werden. Hierbei spielen sogenannte mikrobeassoziierte Immunstimulanzien eine wichtige Rolle. Zu diesen Stimulanzien zählen zum Beispiel wirtsfremde Moleküle auf der Zelloberfläche der Mikroorganismen, wie die Lipopolysaccharide (LPS) auf gram-negativen Bakterien oder die Teichonsäure auf gram-positiven Bakterien, aber auch unmethylierte CpG-DNA, die bei vielen Krankheitserregern vorkommt. Häufig weisen die Mikroorganismen auch regelmäßige Muster molekularer Strukturen auf, die als pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) bezeichnet werden. Neben diesen PAMPs werden zudem auch endogene molekulare Strukturen erkannt, die z.B. bei Zellschäden auftreten können und daher auch schadenassoziierte molekulare Muster (damage-associated molecular patterns, DAMPs) genannt werden. Erkannt werden die Moleküle, PAMPs und DAMPs von sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition receptors, PRR). Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem die löslichen Rezeptoren des Komplementsystems, aber auch die membrangebundenen Rezeptoren der Toll-like Rezeptorfamilie (TLR). Der über die Toll-like Rezeptoren ausgelöste Signalweg führt schließlich zur Produktion wichtiger Mediatoren der angeborenen Immunantwort, wie verschiedener Zytokine und Chemokine, und zur Expression kostimulatorischer Moleküle an der Zelloberfläche, die für den Beginn der adaptiven Immunantwort existentiell sind [26, 45].

1.1.1.1 Dendritische Zellen - ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Das erste Mal beschrieben wurden DC von Paul Langerhans, der sie 1868 noch als Nervenzellen in der menschlichen Haut identifizierte [51]. 1973 wurden sie von Ralph M. Steinman und Zanvil A. Cohn weiter charakterisiert und erhielten ihren Namen aufgrund der Ausläufer, die sich während ihrer Reifung ausbilden [90].

Durch zahlreiche weitere Forschungen weiß man heute, dass die DC aus einer heterogenen Mischung verschiedenster Subpopulationen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen bestehen [87].

Ihren Ursprung haben dabei alle DC im Knochenmark, wo sie sich wie die übrigen Leukozyten, aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) entwickeln. Dabei wird bei der Differenzierung der HSC in eine myeloide und eine lymphoide Keimbahn unterschieden. Aus den myeloiden Vorläuferzellen (common myeloid progenitor, CMP) entwickeln sich Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten [4]. Während aus den lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor, CLP) B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen hervorgehen [49]. Die größte Anzahl der DC entsteht über die myeloide Keimbahn, wobei sich aus der CMP eine Monozyten-DC-Vorläuferzelle (monocyte-DC progenitor, MDP) entwickelt, die zur DC Vorläuferzelle (common DC progenitor, CDP) wird. Aus dieser CDP gehen wiederum verschiedene DC Subpopulationen hervor [65].

Bei den DC Subpopulationen werden zwei Gruppen unterschieden. Dabei spielen neben der kleineren Gruppe der plasmazytoiden DC (pDC) vor allem die große Gruppe der konventionellen DC (conventional DC, cDC) eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort. Die cDC gehen aus einem weiteren Entwicklungsschritt der CDP, den so genannten preDC hervor. Diese preDC verlassen das Knochenmark und wandern in das Gewebe, wo sie nach einem Antigenkontakt weiter heranreifen. cDC zeichnen sich durch eine hohe Expression der Integrin- α Kette (cluster of differentiation 11c, CD11c) und einer hohen Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major Histocompatibility Complex, MHC)-Klasse-II aus und unterscheiden sich so von den pDC, die eine mittlere Expression an CD11c und MHCII aufweisen. Darüber hinaus können cDC anhand ihrer Expression der Korezeptoren CD8 α und CD4 in drei weitere Untergruppen CD4⁻ CD8 α ⁺, CD4⁺ CD8 α ⁻ und doppelt negative CD4⁻ CD8 α ⁻ cDC unterschieden werden [102].

Neben dem beschriebenen myeloiden Weg können sich DC auch über die lymphoide Keimbahn entwickeln [9, 61]. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sich unter inflammatorischen Bedingungen DC aus Monozyten entwickeln [72]. Sie werden dann als monozytäre DC (moDC) bezeichnet und besitzen ähnliche Eigenschaften wie die cDC (Abbildung 1).

Kommt es zu einem Eindringen von Pathogenen, wandern DC zum Ort der Infektion, nehmen die eingedrungenen Erreger über rezeptorvermittelte Phagozytose oder Pinozytose auf und zerlegen sie in einzelne Peptidfragmente. Die aktivierte DC beginnt zu reifen, ändert ihre Form und wandert zu den peripheren lymphatischen Organen. Dabei beginnt sie kostimulatorische Proteine auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und Zytokine zu sezernieren [41]. In den peripheren Lymphorganen angekommen, werden die Peptidfragmente der prozessierten Antigene über MHC-Peptidkomplexe den T-Zellen präsentiert, die dadurch ihrerseits aktiviert werden [40]. Aufgrund dieser Funktion werden die DC auch als antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cell, APC) bezeichnet.

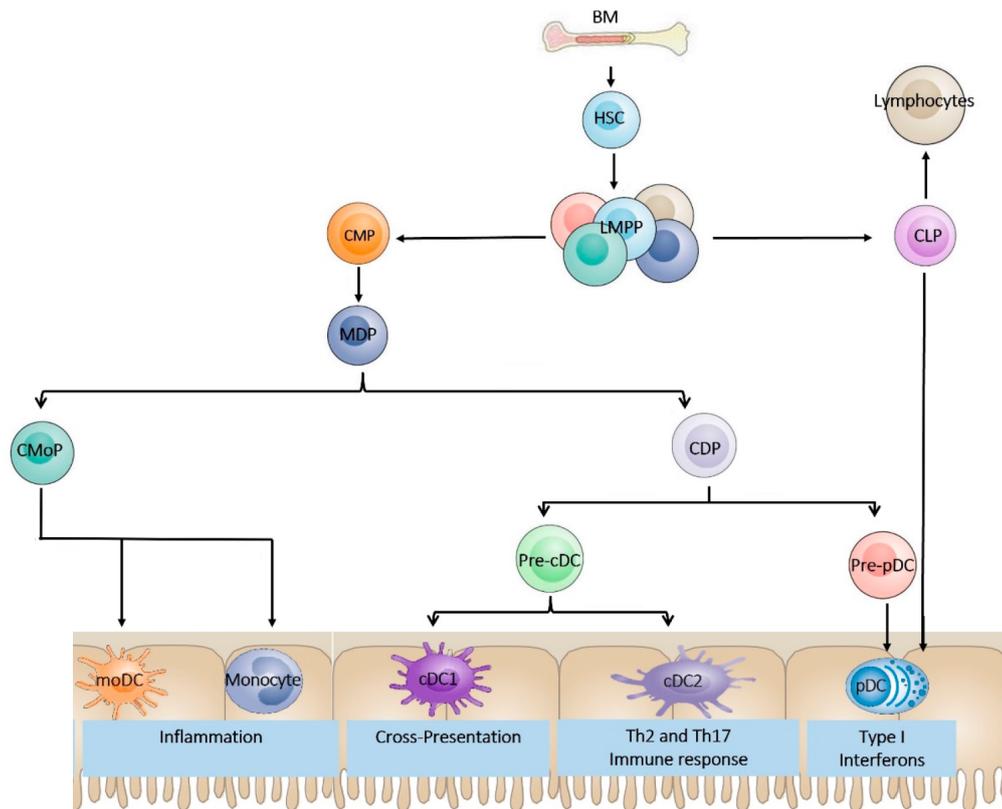


Abbildung 1: Entwicklung der Subpopulationen der dendritischen Zellen (adaptiert nach Khan *et al.* [46]). Dendritische Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (BM, bone marrow), die sich zu lymphatisch geprägten Progenitorzellen (lymphoid-primed multipotent progenitors, LMPPs) entwickeln. Aus den LMPPs gehen zwei verschiedene Keimbahnen hervor. Es können sich myeloide Vorläuferzellen (common myeloid progenitor, CMP) oder lymphoide Vorläuferzellen (common lymphoid progenitors, CLP) entwickeln. Während aus den CLP vor allem Lymphozyten wie B- und T-Zellen und NK-Zellen entstehen, gehen aus den CMP die Monozyten-DC-Vorläuferzellen (monocyte-DC progenitor, MDP) hervor, die zu DC-Vorläuferzellen (common DC progenitor, CDP) werden. Aus diesen CDP gehen wiederum verschiedene DC-Subpopulationen, die konventionellen DC (conventional DC, cDC) und die plasmazytoiden DC (plasmacytoid DC, pDC) hervor, die schließlich im Gewebe weiter ausdifferenzieren. Neben dem myeloiden Weg können sich DC auch über die lymphoide Keimbahn aus den CLP entwickeln. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass DC unter inflammatorischen Bedingungen auch aus einer Vorläuferzelle der Monozyten (common monocyte progenitor, CMoP) entstehen können. Pre-pDC, pre-plasmacytoid DC; Pre-cDC, pre-conventional DC; cDC1, conventional type I DC; cDC2, conventional type II DC

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Bei der adaptiven Immunantwort steht die Aktivierung der Lymphozyten durch die APC im Mittelpunkt. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Lymphozyten, die B-Lymphozyten (B-Zellen) und die T-Lymphozyten (T-Zellen). Ihren Ursprung haben beide Zelltypen im Knochenmark, während die B-Zellen jedoch auch im Knochenmark heranreifen, wandern die unreifen Vorläuferzellen der T-Zellen aus dem Knochenmark in den Thymus, wo sie schließlich heranreifen und dem sie auch ihren Namen verdanken [112]. Doch nicht nur im Ort ihrer Reifung unterscheiden sich die beiden Zelltypen, sie exprimieren auch unterschiedliche Antigenrezeptoren. Dabei sind diese Antigenrezeptoren jedoch im Gegensatz zu den Antigenrezeptoren des angeborenen Immunsystems sehr spezifisch und erkennen jeweils nur ein bestimmtes Antigen [71].

Nach ihrer Reifung in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus), zirkulieren die Lymphozyten in der Lymphflüssigkeit und im Blut. Dabei besitzen sie nur eine geringe funktionelle Aktivität solange noch kein Antigen an ihre Rezeptoren gebunden hat. Man bezeichnet sie in dieser Phase auch als naive (ungeprägte) Lymphozyten. Erst wenn das für sie jeweils spezifische Antigen an ihre Rezeptoren bindet werden sie aktiviert, proliferieren und differenzieren zu den entsprechenden Effektorzellen. Bei den B-Zellen werden diese Effektorzellen Plasmazellen genannt. Sie produzieren Antikörper, die der sezernierten Form des B-Zellrezeptors entsprechen und die dieselbe Antigenspezifität wie dieser aufweisen. Diese Art der Immunantwort wird auch als humorale Immunantwort bezeichnet [71].

Im Gegensatz zu den B-Zellen unterscheidet man bei den T-Zellen drei Gruppen von T-Zellen, die zytotoxischen T-Zellen, die T-Helferzellen und die regulatorischen T-Zellen. Die zytotoxischen T-Zellen töten mit Viren oder anderen intrazellulären Erregern infizierte Zellen direkt [7]. T-Helferzellen hingegen unterstützen, wie der Name schon sagt, andere Zellen, wie Makrophagen, B-Zellen und DC bei ihrer immunologischen Wirkung, indem sie Zytokine sezernieren und entsprechende Proteine auf ihrer Oberfläche exprimieren [103]. Die regulatorischen T-Zellen übernehmen ihrerseits die Kontrolle der Immunantworten. Sie können die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und auch dendritischen Zellen unterdrücken und tragen so unter anderem auch zur immunologischen Selbsttoleranz bei [13]. Die durch die T-Zellen ausgelöste Immunantwort wird auch als zelluläre Immunantwort bezeichnet.

In Kontakt mit ihrem jeweiligen Antigen kommen die T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen, zu denen die Lymphknoten, die Milz und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute zählen. Hier werden die von den antigenpräsentierenden Zellen, hauptsächlich DC, prozessierten Peptidfragmente den T-Zellen über die MHC-Moleküle präsentiert.

1.1.2.1 T-Zellen

T-Zellen entstehen wie die DC aus den HSC im Knochenmark, ihre Reifung geschieht jedoch im Thymus. Dabei wandern lymphoide Vorläuferzellen über das Blut in den Thymus und durchlaufen dort ein komplexes Differenzierungsprogramm, bei dem es auch zu einer negativen Selektion kommt, bei der die Zellen, die körpereigene MHC-Moleküle nicht erkennen können, aussortiert werden [57, 85].

Wie die DC lassen sich auch die T-Zellen in verschiedene Gruppen unterteilen. Dabei unterscheidet man zunächst aufgrund der Zusammensetzung des T-Zell-Rezeptors (TCR, T cell receptor) in $\alpha:\beta$ und $\gamma:\lambda$ T-Zellen, wobei die $\alpha:\beta$ den größten Teil der T-Zellen ausmachen [69]. Darüber hinaus werden die T-Zellen wie die DC auch anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle weiter unterschieden.

Ein Marker für alle T-Lymphozyten ist dabei der CD3 Komplex, der mit dem TCR verbunden ist. Darüber hinaus lassen sich die T-Zellen anhand der Glykoproteine CD4 und CD8, die als Korezeptoren fungieren, weiter unterteilen [50]. Dabei wird CD4 von den T-Helferzellen und CD8 von den zytotoxischen T-Zellen exprimiert.

Die CD4⁺ T-Helferzellen wiederum lassen sich anhand verschiedener Marker in weitere Untergruppen, zu denen die T_H1-, T_H2-, T_H17-Zellen sowie die T_{reg} zählen, unterteilen. Sie unterscheiden sich zudem stark in den von ihnen sezernierten Zytokinen [83].

Auch die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen lassen sich anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle weiter unterteilen. Eine gute Möglichkeit, die CD8⁺ T-Zellen weiter zu unterteilen, bietet die Expression von CD44 und L-Selektin (CD62L). L-Selektin ist ein Adhäsionsmolekül, das von reifen T-Zellen exprimiert wird und die Funktion eines Lymphknoten-Homing-Rezeptors für reife naive T-Zellen hat. Nach einem Antigenkontakt wird die Expression von CD62L herunter reguliert, so dass Effektorzellen kein CD62L mehr exprimieren [74]. CD44 wiederum ist ein Adhäsionsmolekül, das in geringeren Mengen von naiven T-Zellen exprimiert wird und nach deren Aktivierung hochreguliert wird. So lassen sich anhand dieser beiden Marker drei unterschiedliche Gruppen der CD8⁺ T-Zellen einteilen. Naive CD8⁺ T-Zellen (T_N), die CD62L und geringe Mengen an CD44 exprimieren, CD8⁺ T-Effektorzellen (T_E) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}, effector memory T cells), die kein CD62L aber große Mengen an CD44 exprimieren und Central Memory T-Zellen (T_{CM}), die sowohl CD62L als auch CD44 exprimieren [2, 73] (Abbildung 2).

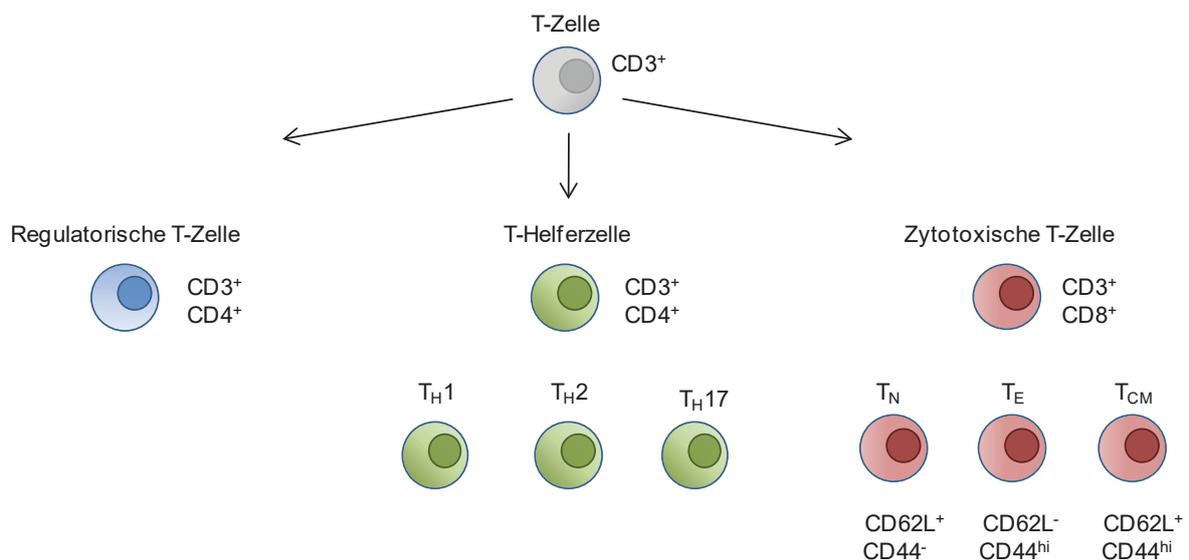


Abbildung 2: Schematische Darstellung der T-Zellsubpopulationen. Anhand ihrer Oberflächenmoleküle und Effektorfunktionen lassen sich die T-Zellen in verschiedene Subpopulationen unterteilen. CD, cluster of differentiation; T_H, T-Helferzelle; T_N, naive T-Zelle; T_E, Effektor T-Zelle; T_{CM}, Central Memory T-Zelle

Reife naive Lymphozyten zirkulieren kontinuierlich durch die peripheren lymphatischen Organe, zu denen neben den Lymphknoten auch die Milz und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute zählen. Treffen sie dort auf DC, die das für sie spezifische Antigen über MHC-Moleküle präsentieren, werden sie aktiviert und beginnen sich zu teilen. Dabei entstehen identische Tochterzellen, die den gleichen TCR exprimieren wie die Ursprungszelle. Dieser Vorgang wird daher auch als klonale Expansion bezeichnet und ermöglicht es dem Körper schnell und gezielt eine große Anzahl spezifischer Lymphozyten im Kampf gegen die Pathogene bereitzustellen [1]. Diese differenzieren weiter und die meisten Zellen gelangen als Effektorzellen zurück in den Blutkreislauf, über den sie sich dann verteilen und in die Gewebe gelangen, um dort schließlich aktiv zu werden. Dieser Prozess der adaptiven Immunantwort dauert beim ersten Kontakt zu einem bisher unbekanntem Erreger vier bis sechs Tage ab Erkennen des Erregers. Naive Lymphozyten, die keinen Kontakt zu dem für sie spezifischen Antigen haben, gelangen wieder ins Blut und zirkulieren weiter durch die lymphatischen Gewebe bis sie ihr Antigen erkennen oder absterben [71].

Auch die Lebenszeit der durch die klonale Expansion entstandenen Lymphozyten ist begrenzt und so sterben die meisten von ihnen ab, wodurch die zelluläre Immunantwort begrenzt wird. Eine kleine Anzahl der aktivierten antigenspezifischen T-Zellen bleibt jedoch erhalten und bildet als Gedächtniszellen die Grundlage für das immunologische Gedächtnis [70]. Sie können bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger viel schneller aktiviert werden und stellen so sicher, dass die Immunreaktion bei einer erneuten Infektion schneller und wirksamer abläuft.

1.2 Diabetes mellitus

1.2.1 Formen des Diabetes mellitus

Als Diabetes mellitus wird eine Gruppe von Erkrankungen bezeichnet, bei denen der Glukosestoffwechsel gestört ist. Es kommt zu einer Hyperglykämie, erhöhte Glukosekonzentration im Blut, die auch Auswirkungen auf verschiedene zelluläre Prozesse und die Immunantwort haben kann.

Man unterscheidet dabei hauptsächlich zwei Arten des Diabetes, Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) und Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM). Beim T1DM kommt es aufgrund einer Autoimmunreaktion zu einem Insulinmangel, da die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas in einem autoreaktiven Prozess zerstört werden. Eine entscheidende Rolle nehmen dabei autoreaktive zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen ein, die gegen bestimmte Antigene der β -Zellen gerichtet sind [97].

Beim T2DM kommt es hingegen zu einer Insulinresistenz aufgrund einer verminderten Sensitivität der Körperzellen gegenüber Insulin. Dabei tritt T2DM häufig im Zusammenhang mit Übergewicht und einer ungesunden Ernährung auf. Sport und eine Umstellung der Ernährungsgewohnheiten können hier häufig zu einer Verbesserung führen [58, 111]. Im Gegensatz dazu sind Patienten, die von T1DM betroffen sind, ihr Leben lang auf die Einnahme von exogenem Insulin angewiesen. Bevor das Insulin entdeckt wurde, war T1DM eine meist tödlich verlaufende Krankheit [36].

Neben den erwähnten beiden Hauptformen des Diabetes mellitus gibt es auch noch den Gestationsdiabetes mellitus (GDM), der während der Schwangerschaft auftreten kann, sowie andere spezifische Diabetesformen, deren Ursache sehr verschieden sein kann. So können beispielsweise verschiedene Erkrankungen des endokrinen Pankreas, wie etwa Pankreatitis, Traumen oder Tumore den Glukosestoffwechsel beeinflussen. Aber auch medikamentöse Einflüsse oder genetische Defekte können eine Veränderung im Glukosestoffwechsel bewirken [34].

1.2.2 Folgen des Diabetes mellitus

Durch die gestörte Funktion des Insulins kann die Glukose nicht mehr adäquat von den Zellen aufgenommen werden und reichert sich im Blut an. Der Körper versucht diesen Anstieg auszugleichen, indem er die Glukose über den Urin ausscheidet, daher kommt es zu einer Polyurie verbunden mit einer Polydipsie, da der Körper versucht den Flüssigkeitsverlust zu kompensieren. Weitere Symptome können Müdigkeit, Sehstörungen und Gewichtsverlust sein. Bei chronischer Hyperglykämie besteht zudem die Gefahr, dass Organe (Augen, Nieren, Herz), Nerven, Blutgefäße und andere Gewebe geschädigt werden. So erhöht Diabetes auch das Risiko für vaskuläre Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit und Schlaganfall [39].

Bei absolutem Insulinmangel kann sich zudem eine Ketoazidose entwickeln. Sie entsteht, wenn die Zellen aufgrund des Insulinmangels nicht genügend Glukose als Energielieferant für ihre Stoffwechselprozesse aufnehmen können. Um diesen Verlust zu kompensieren, beginnt der Körper Fettgewebe abzubauen, um die fehlende Energie auszugleichen. Bei diesem Prozess kommt es jedoch zu einem unvollständigen Abbau der Fettsäuren und es sammeln sich Ketonkörper im Blut an, die schließlich zu einer Übersäuerung des Blutes führen [66, 107].

1.2.3 T1DM - eine Autoimmunerkrankung

Ein entscheidendes Merkmal des T1DM ist die Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas durch eine Immunreaktion, die gegen die körpereigenen Zellen gerichtet ist. Diese Reaktion ist mikroskopisch durch eine Infiltration der Langerhans-Inseln im

Pankreas, in denen sich die insulinproduzierenden β -Zellen befinden, mit verschiedensten Immunzellen, vor allem zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen, gekennzeichnet. Aber auch Makrophagen, $CD4^+$ T-Zellen, B-Lymphozyten und Plasmazellen sind in den Infiltraten zu finden. Zu einem geringen Anteil sind auch NK-Zellen und Forkhead-Box-Protein P3 positive ($FOXP3^+$) Zellen in den Infiltraten zu finden [10].

Die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen sind dabei gegen bestimmte Antigene der β -Zellen gerichtet. Zu diesen Antigenen gehören unter anderem Epitope des Proinsulins [99], der Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65) [101] und des Zinktransporters ZnT8 [27]. Zudem spielen Autoantikörper gegen diese Antigene der Inselzellen eine wichtige Rolle. Sie sind bereits Monate oder sogar Jahre vor der Manifestation des Diabetes im Blut nachweisbar und dienen als wichtiger diagnostischer Marker bei der Feststellung des T1DM. Die meisten Fälle des T1DM werden bereits im Jugendalter diagnostiziert, daher wurde der T1DM früher auch als juveniler Diabetes bezeichnet. Dabei ist T1DM eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter und die Inzidenz ist in den letzten Jahrzehnten noch angestiegen [10].

Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass eine Erkrankung auch im Erwachsenenalter nicht ausgeschlossen ist [17, 55].

1.3 Sepsis

1.3.1 Die Definition der Sepsis

Eine Sepsis, im Volksmund häufig als Blutvergiftung bezeichnet, tritt auf, wenn die lokale Begrenzung einer Immunantwort überschritten wird und es zu einer systemischen Immunreaktion kommt. Dabei wurde die Definition einer Sepsis im Laufe der Jahre immer wieder angepasst. Lange ging man von einem linearen Verlauf aus, bei dem eine Sepsis durch eine anfängliche Infektion, gefolgt von der Entwicklung eines systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS), entsteht. Die Sepsis ist in diesem Modell gefolgt von einer schweren Sepsis, bei der zu der anfänglichen Sepsis noch eine Schädigung der Organe kommt und endet in einem septischen Schock, bei dem neben der schweren Sepsis noch eine Hypertonie auftritt. Doch mit den Jahren zeichnete sich ab, dass dieser Verlauf lange nicht bei jeder Erkrankung auftreten muss und so wurde nach einer neuen Definition gesucht, die sich auch klinisch leichter anwenden lässt, um Patienten mit einer schlechteren Prognose schneller identifizieren zu können. In der dritten internationalen Consensus Definition für Sepsis und septischer Schock von 2016 wird die Sepsis daher als eine „lebensbedrohliche Organdysfunktion, der eine deregulierte Immunantwort des Wirtes auf eine Infektion vorausgeht“, beschrieben. Ein septischer Schock ist dabei eine besondere Form der Sepsis, der per Definition schwerwiegende zelluläre und metabolische

Veränderungen sowie Durchblutungsstörungen umfasst und mit einem höheren Sterblichkeitsrisiko verbunden ist als die Sepsis alleine. Der Begriff der schweren Sepsis sollte nicht weiter verwendet werden, da per Definition bei jeder Sepsis eine Organdysfunktion vorliegt [88]. Zur Festlegung der Schwere der Organdysfunktion wird der sogenannte Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score) verwendet, bei dem klinische Parameter aus verschiedenen Bereichen wie Atmung, zentrales Nervensystem, Herz-Kreislauf-System, Leberfunktion, Blutgerinnung und Nierenfunktion erfasst und mit einem Punktesystem bewertet werden. Eine Organdysfunktion liegt vor, wenn der SOFA-Score um mindestens zwei Punkte steigt [24].

1.3.2 Zelluläre und molekulare Veränderungen während einer Sepsis

Kennzeichnend für die erste Phase der Sepsis ist eine überschießende Immunantwort des Körpers, die sogenannte Hyperinflammation, bei der es vermehrt zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren, wie Interleukin (IL)-1, Tumornekrosefaktor (TNF) und IL-17, durch die Zellen des angeborenen Immunsystems kommt. Die so aktivierten Lymphozyten produzieren ihrerseits wiederum proinflammatorische Zytokine, was zu einem sogenannten Zytokinsturm führt [24]. Durch diese systemische Inflammation kann es dann zur Schädigung von Geweben und Organen und im schlimmsten Fall zu einem Multiorganversagen kommen [81].

Trotz des medizinischen Fortschritts stellt die Sepsis immer noch eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen dar [31, 82]. Doch selbst wenn die Patienten diese kritische Phase überleben, bleiben sie, auch nachdem die Sepsis abgeklungen ist, weiterhin anfälliger für nosokomiale und andere Folgeinfektionen und weisen eine höhere Sterblichkeit auf [80, 105, 110]. Denn unmittelbar nachdem die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine begonnen hat, werden auch antiinflammatorische Zytokine produziert, um die proinflammatorische Reaktion zu regulieren. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei IL-10, das von verschiedenen Zellen sezerniert wird und supprimierend auf die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und Interferon (IFN)- γ , wirkt. Zudem regt es die Produktion von löslichen TNF-Rezeptor- und IL-1-Rezeptor-Antagonisten an, die die proinflammatorische Signalübertragung durch TNF- α und IL-1 Signalwege neutralisieren [24].

Doch nicht nur auf Ebene der Signaltransduktion gibt es Veränderungen, auch auf zellulärer Ebene zeigen sich sowohl bei der angeborenen als auch der erworbenen Immunität erhebliche Defizite, die zu dem Status der Immunsuppression nach einer Sepsis beitragen. So ist bei den Neutrophilen die Chemotaxis gestört, wodurch sie nicht in ausreichendem Maße zum Ort der Infektion gelangen um dort bei der Beseitigung der Erreger zu helfen [6]. Auch konnte beobachtet werden, dass es während einer Sepsis zu einer vermehrten

Apoptose bei Lymphozyten und DC kommt [59, 95]. Darüber hinaus zeigen DC septischer Patienten nach der Stimulation mit LPS eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine gesteigerte Produktion des antiinflammatorischen IL-10 [77].

Auch in einem murinen Modell für die polymikrobielle Sepsis, der zökalen Ligation und Punktion (cecal ligation and puncture, CLP) weisen die DC einen dysfunktionalen Phänotyp auf, d.h. sie produzieren vermehrt das antiinflammatorische IL-10 und geringere Mengen an IL-12 [32]. Ebenso weisen neu generierte BMDC der septischen Mäuse, die unter Verwendung des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (granulozyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) aus Knochenmarkzellen generiert wurden, eine erhöhte IL-10 Produktion auf, was darauf schließen lässt, dass die Dysfunktion bereits im Knochenmark entsteht [76].

1.3.3 Der Einfluss des T1DM auf die Sepsis

Die Schwere, bzw. der Ausgang einer Sepsis kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Neben dem Geschlecht, der Ethnie und dem Alter der Patienten spielen auch Begleiterkrankungen eine entscheidende Rolle [28]. Diabetes mellitus nimmt dabei einen hohen Stellenwert ein, nicht nur weil die Zahl der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat. An Diabetes erkrankte Patienten sind auch anfälliger gegenüber Infektionen und haben ein erhöhtes Risiko für Komplikationen bei einer Sepsis [75].

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass T1DM die Überlebenschancen der Mäuse verringert, wenn sie einer durch eine CLP ausgelösten polymikrobiellen Sepsis ausgesetzt werden. Dabei konnte dies für verschiedene murine Modelle des T1DM gezeigt werden. So zeigen Akita-Mäuse, die eine Mutation des Insulins und einen Verlust der β -Zellfunktion aufweisen, eine um 75 % erhöhte Sterblichkeitsrate gegenüber den Wildtyp-Tieren [75]. Bei NOD-Mäusen (non-obese diabetic, NOD), die spontan autoimmun T1DM entwickeln können, ist die Sterblichkeitsrate um 30 % erhöht gegenüber nicht diabetischen Tieren [18]. Und auch wenn T1DM durch die Gabe von Streptozotocin (STZ) ausgelöst wurde, ist die Sterblichkeit erhöht [96].

Die Ursache für diese erhöhte Sterblichkeit scheint dabei eine Störung verschiedenster zellulärer Komponenten sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems zu sein.

So ist sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten die Chemotaxis der Neutrophilen gestört und die Phagozytoseleistung im Gegensatz zu den Neutrophilen gesunder Probanden verringert [6, 96]. Auch Makrophagen zeigen in Versuchen mit zwei verschiedenen Modellen für T1DM in Mäusen, NOD und STZ-induziert, Veränderungen. Die Expression von MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) und STAT1 (signal transducer and activator of

transcription 1) ist bei den diabetischen Tieren erhöht und die Menge an Leukotrien B₄ ist sowohl in den Makrophagen als auch im Serum der diabetischen Tiere höher als bei den nicht diabetischen Kontrolltieren, was zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine bei den diabetischen Tieren führt [30]. Inwieweit auch dendritische Zellen an der erhöhten Sterblichkeit beteiligt sind und welchen Einfluss die autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen auf die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems haben könnten, ist noch unklar.

2. Zielsetzung der Arbeit

Typ 1 Diabetes mellitus ist eine Autoimmunerkrankung, bei der die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zerstört werden. Eine zentrale Rolle spielen dabei autoreaktive zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen, die gegen bestimmte Autoantigene in den β -Zellen gerichtet sind. Patienten, die an T1DM leiden, weisen eine höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen und mit ihnen verbundenen Komplikationen, wie beispielsweise einer Sepsis, auf [75].

Eine Sepsis tritt auf, wenn bei einer Infektion die lokale Begrenzung der Immunantwort überschritten wird und es zu einer systemischen Immunreaktion kommt. Dabei kommt es zu lebensbedrohlichen Organdysfunktionen, die häufig tödlich enden. Neben der akuten Endzündungsreaktion kommt es bei einer Sepsis darüber hinaus zu einer Immunsuppression, die auch bestehen bleibt, wenn die eigentliche Infektion abgeklungen ist [37].

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dysfunktionale DC an der postseptischen Immunsuppression beteiligt sind. Sie produzieren nach Stimulation höhere Mengen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und geringere Mengen des proinflammatorischen Zytokins IL-12 und tragen so z.B. zu einer verminderten T_H1 -Antwort bei. Diese Dysfunktion der DC ist bereits auf eine veränderte Differenzierung der DC im Knochenmark zurückzuführen [76].

In der folgenden Arbeit sollte untersucht werden, ob T1DM die Immunsuppression während einer Sepsis verstärkt und so zu der erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen und Komplikationen bei einer Sepsis beiträgt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde T1DM unter Verwendung des Low-Dose Streptozotocin Modells in C57BL/6-Mäusen induziert. Zur Untersuchung der Auswirkungen des T1DM auf die DC während der Sepsis wurde das murine Modell der polymikrobiellen Sepsis, die zökale Ligation und Punction (cecal ligation and puncture, CLP) verwendet.

Neben den Auswirkungen des T1DM auf die Immunsuppression bei Sepsis, sollte in einem weiteren Schritt der Frage nachgegangen werden, ob die T-Zellen der diabetischen Tiere einen Einfluss auf die Differenzierung der DC im Knochenmark haben und so zu einer verstärkten Immunsuppression beitragen. Hierzu wurde T1DM in NMRI-Mäusen induziert. Anschließend wurden die $CD8^+$ T-Zellen der diabetischen Tiere und der Kontrolltiere isoliert und in T-Zell-defiziente NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse transferiert, um den Einfluss der T-Zellen auf die dendritischen Zellen *in vivo* zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mäusstämme

C57BL/6

Fünf Wochen alte männliche C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River, Erkrath oder aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen bezogen. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Berücksichtigung der geltenden Tierschutzgesetze des Landes Nordrhein-Westfalen durchgeführt. Um geschlechtsspezifische Unterschiede auszuschließen, wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Alle Tiere hatten, wenn nicht anders beschrieben, uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter während des gesamten Versuchs.

NMRI

Fünf Wochen alte männliche NMRI-Mäuse wurden von Janvier Laboratories, Hannover bezogen.

NMRI-Foxn1^{nu}

Fünf Wochen alte NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse wurden aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Uniklinikums Essen bezogen. Bei diesem Mausstamm handelt es sich um einen immundefizienten Stamm. Die Immundefizienz zeichnet sich durch eine Mutation im Forkhead Box N1 (*Foxn1*) Gen (Chromosom 11) aus, die zu einer kompletten oder teilweisen Aplasie des Thymus führt. Dies hat zur Folge, dass die Tiere keine T-Zellen besitzen, während die übrigen Immunzellen wie DC, NK-Zellen und B-Zellen unverändert sind.

3.1.2 Medien, Puffer und andere Reagenzien

3.1.2.1 Zellkulturmedien

Tabelle 1 - Zellkulturmedien

Zelltyp	Substanz	Bezugsquelle
BMDC	VLE RPMI 1640 + L-Glutamin	Biochrom, Berlin
	10 mM HEPES	Biochrom, Berlin
	0,06 mg/ml Penicillin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
	0,02 mg/ml Gentamicin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
	0,05 mM β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
	10 % FCS	Biochrom, Berlin

Zelltyp	Substanz	Bezugsquelle
T-Zellen	VLE RPMI 1640 + L-Glutamin	Biochrom, Berlin
	0,06 mg/ml Penicillin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
	0,05 mM β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
	10 % FCS	Biochrom, Berlin

3.1.2.2 Serum

In der Zellkultur und bei weiteren Versuchen wurde fötales Kälberserum (FCS) der Firma Biochrom mit einem Endotoxingehalt unter 1,00 EU/ml verwendet. Nach vorheriger Testung wurde für alle Versuche nur eine FCS-Charge verwendet. Vor Gebrauch erfolgte eine Inaktivierung des FCS durch Erwärmung auf 56 °C für 30 min. Durch eine abschließende Zentrifugation (4000 g, 10 min) wurden zudem mögliche Sedimente entfernt.

3.1.2.3 Reagenzien

Tabelle 2 - Reagenzien

Substanz	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Brefeldin A	eBioscience
Collagenase D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CpG-Oligonukleotide ODN 1668	(Sequenz: T*C*C*ATGACGTTTCCTGAT*G*C*T), Eurofins MWG Operon, Ebersberg
EDTA	250 mM Stocklösung
Ethanol	70 % v/v, Apotheke Universitätsklinikum Essen
GolgiStop™	BD Biosciences, Heidelberg
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isofluran (Forene®)	100 % v/v
PepTivator® GAD65 - research grade	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Physiologische NaCL-Lösung	Fresenius Kabi Deutschland
Phorbol 12-Myristate 13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Red Blood Cell Lysing Buffer	Sigma Aldrich, Taufkirchen
rekombinanter muriner Granulozyten- Makrophagen Kolonie -stimulierender Faktor (rmGM-CSF)	PromoKine, PromoCell, Heidelberg
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblaulösung	0,4 %, Sigma Aldrich, Taufkirchen
Vybrant™ CFDA SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific, Göttingen

3.1.2.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 3 - Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
CellWash®	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Blocking Buffer	100ml CellWash® 1 mg mouse IgG, Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-PBS	1,5 M NaCl, 26,8 mM KCl, 14,7 mM KH ₂ HPO ₄ , 27,1 mM Na ₂ HPO ₄
ELISA-Blockpuffer	1 % FCS in PBS
ELISA-Waschpuffer	D-PBS + 0,05 % Tween20, Serva
Na-Citratpuffer	1.47 g Na-Citrate (enzyme grade), Fisher Scientific, 50 ml ddH ₂ O ; pH 4, 5

3.1.3 Kommerzielle Reaktionssysteme und Reagenziensätze

Tabelle 4 - Kommerzielle Reaktionssysteme und Reagenziensätze

Kit	Hersteller
CD4+ T cell Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8a+ T cell Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD11c MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Basic Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences, Heidelberg
Foxp3 Staining Buffer Set®	eBioscience, Frankfurt
IL-6 ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10 ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12p70 ELISA DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
IFN-γ DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	BD Biosciences, Heidelberg
Mouse IL-10 Flex Set	BD Biosciences, Heidelberg
Mouse IL-12p70 Flex Set	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.4 Antikörper

Tabelle 5 - Antikörper

Konjugation	Spezifität	Klon	Bezugsquelle	Isotyp
FITC	CD3e	145-2C11	BD Pharmingen™	Arm Ham IgG1, κ
	CD8	53-6.7	BD Pharmingen™	Rat IgG 2a, κ
	CD40	3/23	BD Pharmingen™	Rat IgG 2a, κ
	I-A/I-E	2G9	BD Pharmingen™	Rat IgG 2a, κ
	Ly6C	AL-21	BD Pharmingen™	Rat IgM, κ
PE	CD4	RM4.5 (RUO)	BD Pharmingen™	Rat IgG 2a, κ
	CD62L	MEL-14	eBioscience	Rat IgG 2b, κ
	CD69	H1.2F3	BD Pharmingen™	Arm Ham IgG 1,λ3
	CD86	GL 1	BD Pharmingen™	Rat IgG 2a, κ
	IFN-γ	XMG1.2	BD Pharmingen™	Rat IgG 1, κ
	IL-12 (p40/p70)	C15.6	BD Pharmingen™	Rat IgG 1
	Ly6G	1A8	BD Pharmingen™	Rat IgG 2a, κ
PE-Cy7	CD25	PC61.5	eBioscience	Rat IgG 1, λ
PerCP-Cy™5.5	CD11b	M1/70	BD Pharmingen™	Rat IgG2b, κ
	CD44	IM7	BD Pharmingen™	
	I-A/I-E	M5/114.15.2		Rat IgG2b, κ
APC	CD3	17A2	eBioscience	-
	CD11c	N418	eBioscience	Arm Ham IgG
	CD25	PC61	BD Pharmingen™	Rat IgG 1, λ
	CD44	IM7	BD Pharmingen™	Rat IgG2b, κ
Pacific Blue™	CD45	30-F11	BioLegend	Rat IgG2b, κ

3.1.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien stammen, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Promega (Darmstadt).

Die Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma BD Medical (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner bio-one (Frickenhausen), Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden), Starlab Deutschland GmbH (Hamburg), Sysmex Partec GmbH (Görlitz) oder Thermo Fisher Scientific (Dreieich) bezogen.

3.1.6 Geräte

Tabelle 6 - Geräte

Anwendungsgebiet	Gerät	Firma
Zellseparation	autoMACS®	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Durchflusszytometrie	FACSCalibur™	Becton, Dickinson and company (BD), Heidelberg
	FACSCanto II™	Becton, Dickinson and company (BD), Heidelberg
ELISA	Mikroplatten-Adsorptionsreader ELx808	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Blutzuckermessung	Stat Strip Xpress-i®	Nova Biomedikal UK, Cheshire

3.1.7 Software

Tabelle 7 - Software

Software	Firma
Excel	Microsoft
CellQuest™ Pro	BD Bioscience
NovoExpress®	Acea Biosciences
FCAP Array Software	BD Bioscience
GraphPad Prism5	GraphPad

3.2 Methoden

3.2.1 Low-Dose Streptozotocin Modell zur Induktion von Typ 1 Diabetes bei Mäusen

Streptozotocin (STZ) ist ein Glucosamin mit einem selektiven toxischen Effekt auf die Insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse (Pankreas). STZ wird darüber hinaus den Nitrosoharnstoffen zugeordnet, da in seiner chemischen Struktur Methylnitrosoharnstoff an die C2-Position von Glucose gebunden ist. Dadurch besitzt STZ alkylierende Eigenschaften, d.h. es bewirkt den Einbau von Alkylgruppen in die DNA und verhindert so die Zellteilung. Der selektive Effekt auf die β -Zellen kommt dadurch zustande, dass Streptozotocin durch seinen Glukoseanteil genauso wie das Zuckermolekül über den GLUT2 Transporter in die Zellen aufgenommen werden kann. Die β -Zellen besitzen wiederum einen hohen Anteil dieses Transporters auf ihrer Zelloberfläche. Wurde das Streptozotocin in die Zelle aufgenommen, kommt es zur Schädigung der DNA und somit zum Funktionsverlust der Zelle.

Zur Induktion des Typ 1 Diabetes mellitus wurden 5 Wochen alte männliche C57BL/6- oder NMRI-Mäuse verwendet, die nach dem Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse) (Diabetic Complications Consortium) behandelt wurden. Bei diesem Protokoll wird durch die Gabe einer geringen Dosis STZ über fünf aufeinanderfolgende Tage ein Autoimmunprozess ausgelöst, der dem menschlichen Typ 1 Diabetes ähnelt.

Zur Durchführung des Protokolls wurde den Tieren vier Stunden vor der Streptozotocin-Gabe das Futter entzogen. Pro Tier wurden 50 mg/kg Streptozotocin in Natrium-Citratpuffer (pH 4,5) oder Natrium-Citratpuffer alleine intraperitoneal injiziert. Der Puffer wurde mit jeder Injektionsrunde frisch angesetzt und der pH-Wert durch Zugabe von Monohydrat Na-Citrat auf pH 4,5 eingestellt. Die entsprechende Menge Streptozotocin (7,5 mg/ml) wurde erst unmittelbar vor der Injektion in Na-Citrat gelöst, da es innerhalb von 15-20 Minuten degradiert. Nach der Injektion wurde den Tieren wieder Futter sowie Wasser mit 10 % Sucrose angeboten, um eine plötzliche Hypoglykämie zu vermeiden. Die Injektion wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt und eine Woche nach der letzten Injektion mit der Messung des Blutzuckerwertes begonnen (Abbildung 3). Es erfolgte eine Kontrolle des Körpergewichts der Mäuse. Die Messungen wurden im wöchentlichen Rhythmus durchgeführt.

Zur Bestimmung der Blutglukosewerte der Mäuse wurden die Tiere fixiert und die Schwanzvene mit einem Skalpell punktiert. Anschließend erfolgte die Messung mittels eines Blutzuckermessgerätes (Stat Strip Xpress-i®, Nova Biomedikal UK). Die Messung erfolgte ohne vorherigen Futterentzug und unter Einhaltung der gleichen Tageszeit. Die Tiere wurden als diabetisch eingestuft, wenn bei zwei aufeinanderfolgenden Messungen die

Blutglukosewerte über 250 mg/dl lagen. Nachfolgend wird der Zeitpunkt der zweiten Messung mit Werten über 250 mg/dl als Beginn des Diabetes bezeichnet. Tiere, die Werte über 600 mg/dl erreichten wurden aus dem Versuch ausgeschlossen.

Neben den Blutglukosewerten, wurden bei den diabetischen Tieren auch die Ketonwerte im Blut bestimmt, um eine mögliche Ketoazidose auszuschließen. Bei einem Anstieg der Werte über 0,6 mmol/l wurden die Tiere vom Versuch ausgeschlossen.

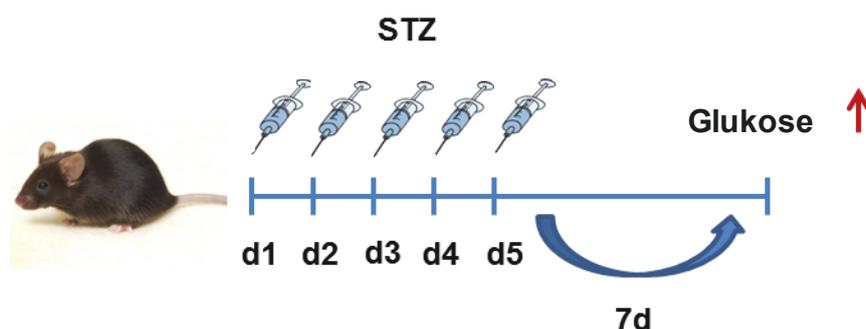


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Behandlung mit Streptozotocin zur Induktion des T1DM. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen bekommen die Mäuse niedrig dosiertes Streptozotocin i.p. injiziert. Diese Behandlung führt bereits eine Woche nach der letzten Injektion zu erhöhten Glukosewerten im Blut der Tiere.

3.2.2 Zökale Ligation und Punktion als murines Modell der polymikrobiellen Sepsis

Die zökale Ligation und Punktion (cecal ligation and puncture, CLP), nach Chaudry *et al.* [106], ist ein anerkanntes murines Modell der polymikrobiellen Sepsis. Die Durchführung der CLP erfolgte unter einer Narkose mit 100 mg/kg Ketamin (CEVA Sante Animale, Düsseldorf) und 10 mg/kg Xylazin (CEVA Sante Animale, Düsseldorf), die den Tieren nach einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran intramuskulär injiziert wurde.

Nach einem laparoskopischen Schnitt entlang der *linea alba* wurde das Cecum freigelegt und das untere Drittel mittels Zuhilfenahme eines sterilen, nicht resorbierbaren Fadens (5-0 Nahtmaterial, Ethicon Norderstedt) ligiert. Nach der Ligation des Cecum wurde es mit einer 27-gauge (G) Nadel einmalig punktiert und ca. 1 µl des Darminhaltes herausgedrückt. Anschließend wurde das Cecum wieder in die Bauchhöhle zurückgeschoben und die Bauchdecke abschließend mit zwei Nähten (Bauchdecke und Haut) geschlossen. Zur besseren Rehydrierung der Tiere wurde 1 ml physiologische NaCl-Lösung in den Bauchraum gegeben. Kontrolltiere erfuhren die gleiche Behandlung, jedoch ohne die Ligation und Punktion des Cecum.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Mäuse nach 24 Stunden getötet und die entsprechenden Organe entnommen (s. 3.2.4).

3.2.3 CD8⁺ T-Zell Transfer von NMRI-Wildtyp in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse

Die CD8⁺ T-Zellen wurden aus der Gesamtheit der Milzzellen diabetischer NMRI-Mäuse oder Kontrolltiere unter Verwendung des CD8⁺ T-Zell-Isolation Kit und des autoMACS® aufgereinigt. Die Verwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben (s. 3.2.5.5). Anschließend wurden die Zellen in PBS aufgenommen. Die Konzentration der Zellen wurde dabei auf 1×10^7 Zellen pro 100 μ l eingestellt. Die Zellen wurden stets auf Eis gehalten.

Für den Transfer der T-Zellen wurden die NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse in einer Fixationsröhre fixiert. Zum Weiten der Vene wurde der Schwanz der Tiere kurz in ein Falcon mit warmem Wasser getaucht und danach desinfiziert. Anschließend wurden den Tieren jeweils 1×10^7 Zellen in 100 μ l PBS in die Schwanzvene injiziert.

Zwei Wochen nach dem Transfer der T-Zellen wurden die Empfängertiere für weitere Untersuchungen getötet und die entsprechenden Organe entnommen (s. 3.2.4).

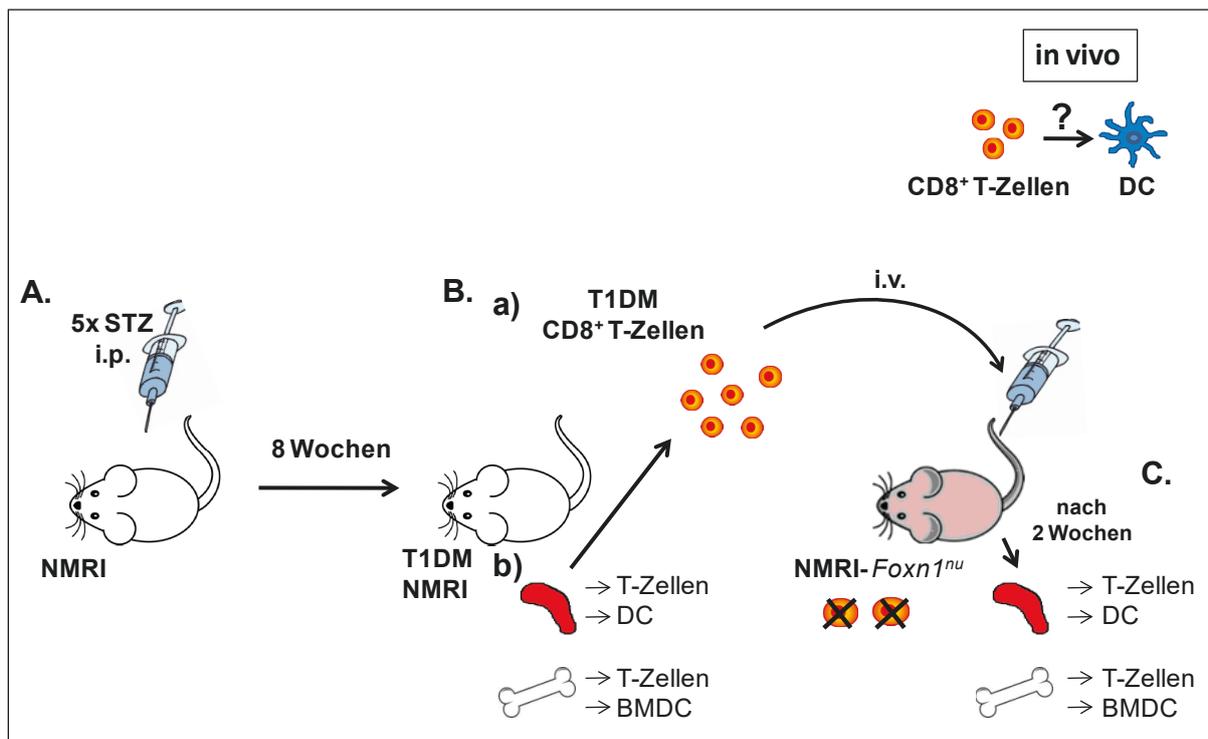


Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Durchführung des CD8⁺ T-Zell-Transfers. T1DM wurde bei fünf Wochen alten NMRI-Mäusen unter Verwendung des Low-Dose Streptozotocin Modells induziert (A). Acht Wochen nach der Induktion des Diabetes wurden die CD8⁺ T-Zellen aus der Milz der diabetischen NMRI-Mäuse mittels MACS® Separation isoliert, in PBS aufgenommen und i.v. in T-Zell-defiziente NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse injiziert (siehe B.a). Darüber hinaus wurde eine FACS-Analyse der Milz- sowie der Knochenmarkszellen der Spendertiere zur Charakterisierung der T-Zellen und DC durchgeführt (siehe B,b). Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark der Empfängertiere isoliert und mittels FACS analysiert. Außerdem wurden für weitere Analysen die DC aus der Milz der Empfängertiere mittels MACS® Separation isoliert und eine Kultur der BMDC angelegt (C).

3.2.4 Organentnahme und Präparation der Zellen

Soweit nicht anders angegeben wurden die Tiere vor der Organentnahme durch eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofloran betäubt und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Isolation und Kultivierung der verschiedenen Zelltypen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die isolierten Zellen und Gewebe wurden zwischen den einzelnen Arbeitsschritten auf Eis gekühlt. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte unter Verwendung einer TrypanBlau-Lösung zur Detektion und Ausschluss bereits abgestorbener Zellen mittels Neubauer-Zählkammer.

3.2.4.1 Peritoneallavage und Isolierung der Peritonealzellen

Für die Isolation der Peritonealzellen wurde den Tieren 3 ml Medium (ohne Antibiotika) in das Peritoneum injiziert. Daraufhin wurde die Maus unter Fixation des Kopfes leicht geschüttelt, damit sich das Medium gut im Bauchraum verteilen konnte. Anschließend wurde das Medium möglichst vollständig wieder aus dem Bauchraum aufgenommen und die darin enthaltene Zellzahl bestimmt. Proben, bei denen es zu einer Verunreinigung mit Blut gekommen war, wurden ausgeschlossen. Zur Untersuchung der bakteriellen Belastung wurden 50 µl des aus dem Bauchraum zurückgewonnenen Mediums abgenommen.

Nach Zentrifugation der übrigen Zellen wurde 1 ml des Überstandes für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren und die Zellen für weitere Analysen mittels Durchflusszytometrie verwendet.

3.2.4.2 Bestimmung der bakteriellen Belastung in der Peritoneallavage

Zur Bestimmung der bakteriellen Belastung wurden 50 µl des aus dem Bauchraum zurückgewonnenen Mediums abgenommen und eine Verdünnungsreihe erstellt. Jeweils 10 µl der entsprechenden Verdünnungen wurden unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die bakterielle Belastung der jeweiligen Proben durch Auszählen der entstandenen Kolonien (CFU, cluster forming units) bestimmt.

3.2.4.3 Isolierung der Milzzellen

Nach Eröffnung des Bauchraumes auf der linken Seite unterhalb des Rippenbogens, wurde die Milz vorsichtig heraus präpariert und in eine Petrischale überführt. Anschließend wurde ca. 1 ml Collagenase D Lösung (400 ng/ml) an drei verschiedenen Stellen in die Milz injiziert, die Milz in drei Stücke geschnitten und die Schale mit weiteren 2 ml Collagenase D Lösung aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 18 min bei 37 °C.

Im Anschluss wurde die Milz in einer Petrischale mit 10 ml Kulturmedium und 5 mM EDTA unter Zuhilfenahme des Stempels einer 2 ml Spritze durch ein 70 µm Zellsieb gerieben. Das Filtrat wurde gut resuspendiert und durch ein 30 µm Zellsieb in ein 15 ml Falcon überführt.

Nach einer Zentrifugation der Zellen erfolgte die Erythrozytenlyse unter Verwendung des Red Blood Cell Lysing Buffer, Sigma Aldrich, Taufkirchen.

3.2.4.4 Isolierung der Knochenmarkzellen

Für die Isolation der Knochenmarkzellen wurden die Knochen der Hinterbeine (Tibia und Femur) von C57BL/6- oder NMRI-Mäusen verwendet. Hierzu wurden die Knochen zunächst vorsichtig aus den Mäusen heraus präpariert und von Muskeln und Gewebe befreit. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 70 %-igem Ethanol. Danach wurden die Knochen mit PBS abgespült. Zur Gewinnung der Zellen wurden die Knochen, unter sterilen Bedingungen, in einer Schale an ihren Enden gekappt und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze mit 27G Kanüle durch injizieren von 5 ml kaltem Medium aus dem Knochen gespült. Nach kurzer Resuspension wurden die Zellen durch ein 30 µm Zellsieb in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt, bei 1500rpm für 6 Minuten zentrifugiert und anschließend eine Erythrozytenlyse unter Verwendung des Red Blood Cell Lysing Buffer, Sigma Aldrich, Taufkirchen, durchgeführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen, gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

3.2.5 Zellkultur

3.2.5.1 Generierung von BMDC

Zur Generierung der BMDC wurden zunächst die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Hinterbeine von C57BL/6- oder NMRI-Mäusen isoliert (s. 3.2.4.4). Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in 100x15mm Petrischalen (Falcon, BD Bioscience). Die Differenzierung der Vorläuferzellen zu dendritischen Zellen wurde durch die Nutzung von GM-CSF gewährleistet, dabei wurden jeweils 2×10^6 der isolierten Zellen in 10 ml Medium mit 20 ng/ml GM-CSF pro Schale ausgesät. Nach drei Tagen wurden 10 ml frisches Medium mit 20 ng/ml GM-CSF zugegeben. An Tag 6 oder 7 wurden 10 ml des alten Mediums entfernt und 10 ml frisches Medium mit 20 ng/ml GM-CSF zugegeben. Die Ernte der BMDC erfolgte an Tag 9, indem alle nicht adhärenen Zellen abgenommen wurden.

3.2.5.2 *In vitro* Stimulation der BMDC

Für die Stimulation der BMDC wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 100µl Medium (mit 20 ng/ml GM-CSF) jeweils in Triplikaten in einer 96-Well-Flachbodenplatte ausplattiert. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ erfolgte die Zugabe von 100µl Medium oder Medium mit 5 µg/ml CpG, bevor die Zellen für weitere 18 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert

wurden. Danach wurden die Überstände abgenommen und für spätere Analysen bei -20 °C eingefroren.

Die Zellen wurden für die Analyse mittels Durchflusszytometrie gefärbt.

3.2.5.3 Isolation der DC aus der Milz

Die Isolation der DC aus der Gesamtheit der Milzzellen der diabetischen Tiere oder Kontrolltiere erfolgte unter Verwendung der CD11c Micro Beads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach und des autoMACS®. Um die Reinheit der isolierten DC zu verbessern, wurden die Zellen zudem vor der Inkubation mit den CD11c Micro Beads für einige Sekunden mit Basic Micro Beads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, inkubiert. Die Verwendung der Beads erfolgte jeweils nach Angabe des Herstellers.

3.2.5.4 *In vitro* Stimulation der Milz-DC

Die aufgereinigten DC aus der Milz wurden in Medium mit 0,3 ng/ml GM-CSF aufgenommen und je 1×10^5 pro Well in 100 µl Medium in einer Rundbodenplatte ausplattiert (Triplikate). Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ erfolgte die Zugabe der CpG Oligonukleotide (5 µg/ml) in 100 µl Medium. Anschließend wurden die Zellen für weitere 18 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert, wobei nach vier Stunden 10 µl GolgiStop™ (1,5 µg/ml) hinzugefügt wurden. Nach der Inkubation wurden die Überstände abgenommen und für spätere Analysen bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden für die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie verwendet.

3.2.5.5 Isolierung der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen aus der Milz

Um die CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen aus der Gesamtzahl der Milzzellen zu isolieren, wurden das CD4⁺ oder CD8a⁺ T cell Isolation Kit (mouse) und das autoMACS® der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, verwendet. Die Anwendung erfolgte unter Einhaltung der Herstellerangaben. Die Reinheit der aufgereinigten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und lag stets über 95 %. Die Zellen wurden für *in vitro* Versuche in der Zellkultur oder *in vivo* für den Transfer CD8⁺ T-Zellen verwendet.

3.2.5.6 Kokultur naiver BMDC mit T-Zellen diabetischer oder nicht diabetischer Tiere

Für die Kokultur naiver BMDC mit T-Zellen diabetischer oder nicht diabetischer Tiere wurden BMDC naiver Tiere an Tag 8 geerntet und anschließend mit CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere oder nicht diabetischer Kontrolltiere in Kultur gebracht. Hierzu wurden 2×10^5 BMDC in 100 µl Medium (mit 20 ng/ml GM-CSF) in einer 96-Well-Flachboden-Platte ausplattiert (Triplikate) und anschließend für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der entsprechenden T-Zellen mit 4×10^5 Zellen pro Well in 50 µl Medium.

Die Stimulation erfolgte mit CpG (5µg/ml) in 50 µl Medium für 18 h bei 37 °C, 5 % CO₂. Anschließend wurden die Überstände abgenommen für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren.

3.2.5.7 Stimulation der Milzzellen mit Peptiden der Glutamat-Decarboxylase

Glutamat-Decarboxylase (GAD) wird von den β-Zellen in den Langerhans-Inseln im Pankreas exprimiert und spielt als Autoantigen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes [43]. PepTrivator®GAD65 von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, ist ein Peptid Pool aus Sequenzen des GAD 65 Proteins (mit einer Länge von 15 Aminosäuren und einer Überlappung von 11 Aminosäuren), der für die *in vitro* Stimulation antigenspezifischer T-Zellen entwickelt wurde. Zur Stimulation möglicher antigenspezifischer T-Zellen wurden die Milzzellen diabetischer Tiere oder nicht diabetischer Kontrolltiere mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen in 100 µl Medium ausgesät und anschließend 100 µl Medium mit oder ohne PepTrivator®GAD65 dazugegeben (jeweils Triplikate). Die Verwendung des PepTrivator®GAD65 erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Inkubation erfolgte für 48 h oder 72 h bei 37 °C, 5% CO₂. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren und die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von IFN-γ hin untersucht.

3.2.5.8 Stimulation der Milzzellen mit PMA und Ionomycin

Für die Stimulation der Milzzellen diabetischer Tiere oder nicht diabetischer Kontrolltiere mit PMA und Ionomycin wurden 5×10^5 Zellen pro Well in 100 µl Medium ausgesät (Triplikate) und eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von PMA (0,5 µg/ml) und Ionomycin (5 µg/ml) in 100 µl Medium sowie die Zugabe von GolgiStop™ (1,5 µg/ml) in 10 µl Medium. Nach einer weiteren Inkubation für vier Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Überstände abgenommen und bei -20 °C für weitere Analysen eingefroren. Die Zellen wurden intrazellulär für IFN-γ gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

3.2.5.9 Analyse der IFN-γ Produktion der Milzzellen ohne vorherige Stimulation

Um die IFN-γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz ohne vorherige Stimulation zu untersuchen, wurden die Milzzellen diabetischer Tiere oder nicht diabetischer Kontrolltiere mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Well in 200 µl ausgesät und anschließend sofort GolgiStop (1,5 µg/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden für acht Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen intrazellulär für IFN-γ gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.2.6 Molekularbiologische Methoden

3.2.6.1 Nachweis verschiedener Zytokine und Chemokine mittels Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Zum Nachweis verschiedener Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen wurden die zuvor bei -20 °C eingefrorenen Überstände aufgetaut und für den jeweiligen ELISA verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für alle ELISA wurden 96-well Maxi-Sorp® Mikrotiterplatten der Firma Nunc, Wiesbaden verwendet. Zur Bestimmung der Konzentration wurden die entsprechenden Proben mit dem Mikroplatten-Absorptionsreader ELx808, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall eingelesen.

3.2.6.2 Nachweis verschiedener Zytokine mittels Zytometrischem Bead Array (CBA)

Neben dem klassischen ELISA wurde zum Nachweis verschiedener Zytokine auch das Zytometrische Bead Array der Firma BD Bioscience verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Analyse der Proben erfolgte am BD FACSCalibur™ mit anschließender Auswertung unter Verwendung der FCAP-Software.

3.2.7 Durchflusszytometrie

Zur weiteren Analyse der Zellen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Hierbei wurden verschiedene extrazelluläre oder intrazelluläre Moleküle untersucht, um die unterschiedlichen Zellpopulationen zu definieren sowie die Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle oder Zytokine bzw. Chemokine zu bestimmen.

3.2.7.1 Extrazelluläre Fluoreszenz-Färbung

Für die Färbung wurden je Probe 1×10^6 Zellen in ein Well einer 96-Well Rundbodenplatte überführt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und je 50 µl des FACS Blocking Buffers (s. Tabelle 3) auf die Zellen gegeben, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Inkubation erfolgte für 6 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antikörper oder Isotypen in 50 µl CellWash®, gefolgt von einer Inkubation für 12 min bei 4 °C im Dunkeln. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurde im Anschluss 100 µl CellWash® je Well zugegeben, die Platte zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Abschließend wurden die Zellen in 250 µl CellWash® aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Bis zur Messung wurden die Zellen auf Eis gehalten.

3.2.7.2 Intrazelluläre Fluoreszenz-Färbung

Für die Färbung wurden zunächst 1×10^6 Zellen in ein Well einer Rundbodenplatte überführt und eine extrazelluläre Färbung der entsprechenden Oberflächenmarker zur Festlegung der zu untersuchenden Zellpopulation durchgeführt.

Anschließend wurde für die intrazelluläre Färbung der Zytokine 150 μl BD Cytifix/Cytoperm™ Fixierungs- und Permeabilisierungslösung zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurden 100 μl BD Perm/Wash Buffer hinzugegeben und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet, die Platte für 30 sek bei 500 rpm auf den Plattenschüttler gestellt und anschließend die entsprechenden Antikörper bzw. Isotypen in 100 μl BD Perm/Wash Buffer auf die Zellen gegeben und für 12 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 100 μl BD Perm/Wash Buffer wurden die Zellen in 250 μl CellWash Buffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

4. Ergebnisse

Eine Sepsis führt neben der anfänglichen Hyperinflammation zu einer Immunsuppression, die auch bestehen bleibt, nachdem die akute Phase der Sepsis überwunden ist [14]. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Immunsuppression im Zusammenhang mit dysfunktionalen DC steht. Nach bakterieller Stimulation sezernieren sie höhere Mengen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und geringere Mengen des proinflammatorischen Zytokins IL-12 und hemmen so z.B. die Entwicklung einer T_H1 -Antwort [32]. Diese Dysfunktion der DC ist auf eine veränderte Differenzierung der DC im Knochenmark zurückzuführen [76].

Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen und gegenüber Komplikationen bei Sepsis [75]. Die Ursache für diese erhöhte Anfälligkeit ist bisher nicht genau bekannt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob T1DM die Anfälligkeit von Mäusen gegenüber einer Sepsis im CLP-Modell erhöht und inwieweit es zu einer Modulation der DC und T-Zellen der diabetischen Tiere unter dem Einfluss des T1DM kommt.

4.1 Etablierung des Modells des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus

Um den Einfluss von T1DM auf verschiedene Immunzellen untersuchen zu können, wurde das Low-Dose Streptozotocin Protokoll (Diabetic Complications Consortium) verwendet, um T1DM in C57BL/6- oder NMRI-Mäusen zu induzieren.

Dabei wurden fünf Wochen alte C57BL/6- oder NMRI-Mäuse eine Woche lang mit Streptozotocin behandelt und anschließend wöchentlich die Blutglukosewerte sowie das Gewicht der Mäuse kontrolliert (s. 3.2.1).

Bereits eine Woche nach der Gabe von Streptozotocin war bei den C57BL/6-Mäusen ein deutlicher Anstieg des Blutglukosespiegels im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu sehen (Abbildung 5A, oben). Während die Werte der Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum von 16 Wochen bei durchschnittlich 130 mg/dl lagen, stieg der Wert der STZ-Gruppe eine Woche nach der Verabreichung von Streptozotocin auf durchschnittlich 210 mg/dl an und erreichte zwei Wochen nach der Behandlung den Schwellenwert von 250 mg/dl, der als Grenzwert zur Bestimmung des Diabetes genommen wurde. Nach sieben Wochen wurde ein Blutglukosewert von 450 mg/dl in der STZ-Gruppe erreicht. Ab der neunten Woche blieben die Werte der Diabetesgruppe konstant bei Konzentrationen um 530 mg/dl.

Der Verlauf der Blutglukosemessung der NMRI-Mäuse ähnelte dem der C57BL/6-Mäuse, jedoch zeigte sich bei den NMRI-Mäusen ein verzögerter, dafür jedoch stärkerer Anstieg der Glukosewerte zu Beginn der Messung (Abbildung 5A, unten). So lagen die Werte der mit Streptozotocin behandelten Tiere eine Woche nach der Streptozotocingabe noch in einem

ähnlichen Bereich wie die der Kontrolltiere. In der zweiten Woche stieg die Glukosekonzentration bei den NMRI-Mäusen auf 350 mg/dl und zeigte dann einen ähnlichen Anstieg wie bei den C57BL/6-Mäusen.

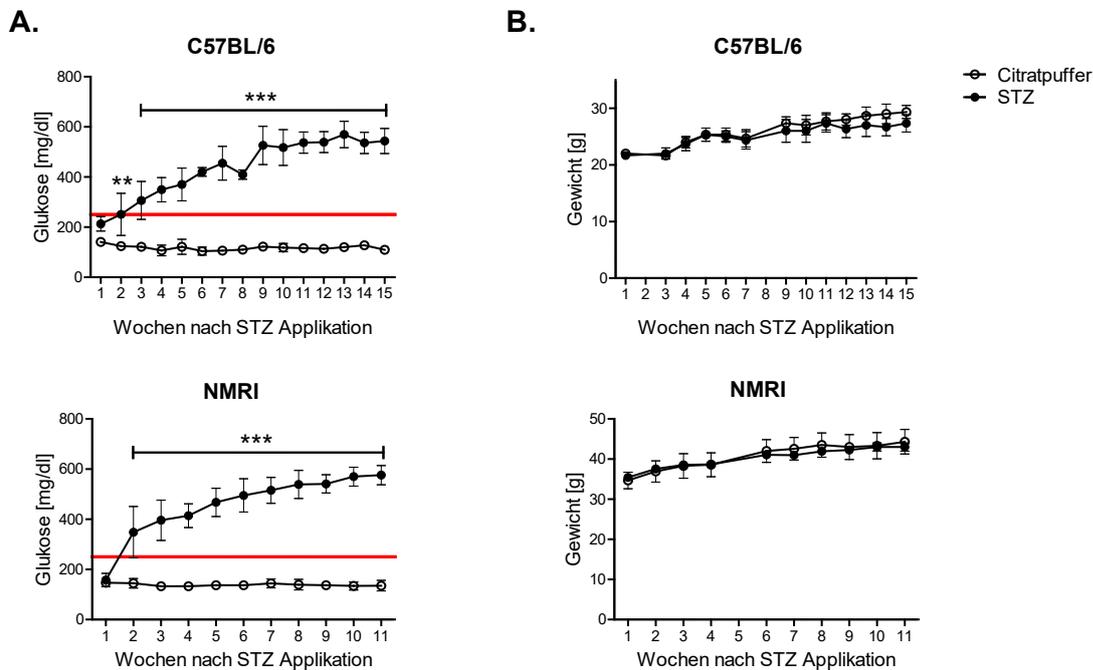


Abbildung 5: Induktion des Diabetes in C57BL/6- oder NMRI-Mäusen durch Gabe von Streptozotocin. Fünf Wochen alte C57BL/6- oder NMRI-Mäuse bekamen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine Injektion mit niedrig dosiertem Streptozotocin oder Citratpuffer (Lösungsmittel für Streptozotocin als Kontrolle) in das Peritoneum, um T1DM zu induzieren. Anschließend wurden wöchentlich Messungen des Blutzuckerspiegels (A) sowie des Körpergewichtes (B) der Mäuse durchgeführt. Die Tiere wurden als diabetisch eingestuft, wenn der Blutglukosespiegel an zwei aufeinander folgenden Messungen einen Wert von 250 mg/dl (A, rote Linie) überschritten hatte. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert von $n = 3-7$ Tieren mit Standardabweichung. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für 23 (C57BL/6) oder acht (NMRI) Experimente. Statistische Unterschiede wurden mittels „two way ANOVA“ mit anschließendem Bonferroni Test bestimmt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Während die Blutglukosewerte der mit Streptozotocin behandelten C57BL/6-Mäuse bereits eine Woche nach der Behandlung deutlich über den Werten der Kontrollgruppe lagen, zeigte sich beim Gewicht der Tiere kein signifikanter Unterschied (Abbildung 5B, oben). Beide Gruppen lagen zu Beginn der Messungen bei durchschnittlich 22 g pro Tier. In beiden Gruppen nahmen die Tiere bis zur siebten Woche leicht zu und erreichten ein Gewicht von durchschnittlich 25 g pro Tier. Danach begannen sich leichte Unterschiede zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und der mit Streptozotocin behandelten Tiere abzuzeichnen. Während die Tiere der Kontrollgruppe bis zur 16. Woche stetig an Gewicht zunahm, kam es bei den mit Streptozotocin behandelten Tieren zu einer reduzierten Gewichtszunahme. Ähnlich verhielt es sich mit dem Gewichtsverlauf der NMRI-Mäuse. Während auch hier beide Gruppen bis etwa zur sechsten Woche in gleicher Weise an Gewicht zunahm, zeigte sich im weiteren Verlauf eine reduzierte Gewichtszunahme bei den diabetischen Tieren (Abbildung 5B, unten).

Nach der Gabe von niedrig dosiertem Streptozotocin stiegen somit die Blutglukosewerte der behandelten Tiere bis zur neunten Woche an und blieben dann auf einem gleichbleibend hohen Niveau. Gleichzeitig kam es im Verlauf zu einer tendenziell verminderten Gewichtszunahme der mit Streptozotocin behandelten Tiere.

4.2 Einfluss des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus im CLP-Modell der Sepsis

4.2.1 Einfluss des T1DM auf die Induktion der Sepsis

Um den Einfluss des T1DM auf die Induktion der Sepsis unter Verwendung des CLP-Modells näher zu untersuchen, wurde T1DM in fünf Wochen alten C57BL/6-Mäusen unter Verwendung des Low-Dose Streptozotocin Protokolls induziert und 15 Wochen nach Feststellung des Diabetes eine CLP-Operation durchgeführt. Als Kontrolle dienten Tiere, die nur Citratpuffer (Lösungsmittel für Streptozotocin) erhielten, sowie Tiere, die nur einer Sham-Operation unterzogen wurden. Vierundzwanzig Stunden nach der Operation wurden durch eine Peritoneallavage Zellen aus dem Bauchraum der operierten Tiere isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Gleichzeitig wurde die bakterielle Belastung der Lavage mittels eines Ausstriches auf einer Blutagarplatte bestimmt.

Der exemplarische Dotplot der durchflusszytometrischen Analyse der Lavage des Peritoneums (Abbildung 6A) zeigt, dass es sowohl bei den diabetischen Mäusen als auch bei den Kontrolltieren zu einem Anstieg der Ly6G⁺ Granulozyten kam, wenn bei den Tieren eine CLP und somit die Induktion einer Sepsis durchgeführt wurde. Im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren stieg der Anteil der Ly6G⁺ Granulozyten bei den CLP-operierten Tieren der Kontrollgruppe von 14,08 % auf 58,17 % und bei den diabetischen Tieren von 12,44 % auf 48,7 % (Abbildung 6Aa). Auch bei der absoluten Anzahl war der Anstieg der Ly6G⁺ Granulozyten im Peritoneum nach der CLP sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den diabetischen Tieren deutlich zu erkennen (Abbildung 6Ab). Während sich jedoch bei der Anzahl L6G⁺ Granulozyten bei den Sham-operierten Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den diabetischen Tieren zeigte, war die Anzahl der eingewanderten L6G⁺ Granulozyten nach der CLP bei den diabetischen Tieren mit durchschnittlich 16 Millionen Zellen deutlich niedriger als bei den Kontrolltieren mit 27 Millionen Zellen.

Die Auswertung der bakteriellen Belastung erfolgte durch Auszählen der Kolonie-formenden Einheiten (colony forming units, CFU) auf einer Blutagarplatte (Abbildung 6B). Dabei war auf der Platte der diabetischen Tiere ein Zählen kaum noch möglich, da sich so viele Kolonien gebildet hatten, dass nahezu die gesamte Platte bedeckt war. Bei der Platte der

Kontrollgruppe hingegen ließen sich die Kolonien noch gut zählen und lagen bei durchschnittlich 300 000 CFU/ml.

Diabetische Tiere zeigten während der akuten Phase der Sepsis also eine verminderte Einwanderung an Granulozyten in den Peritonealraum verbunden mit einer höheren bakteriellen Belastung.

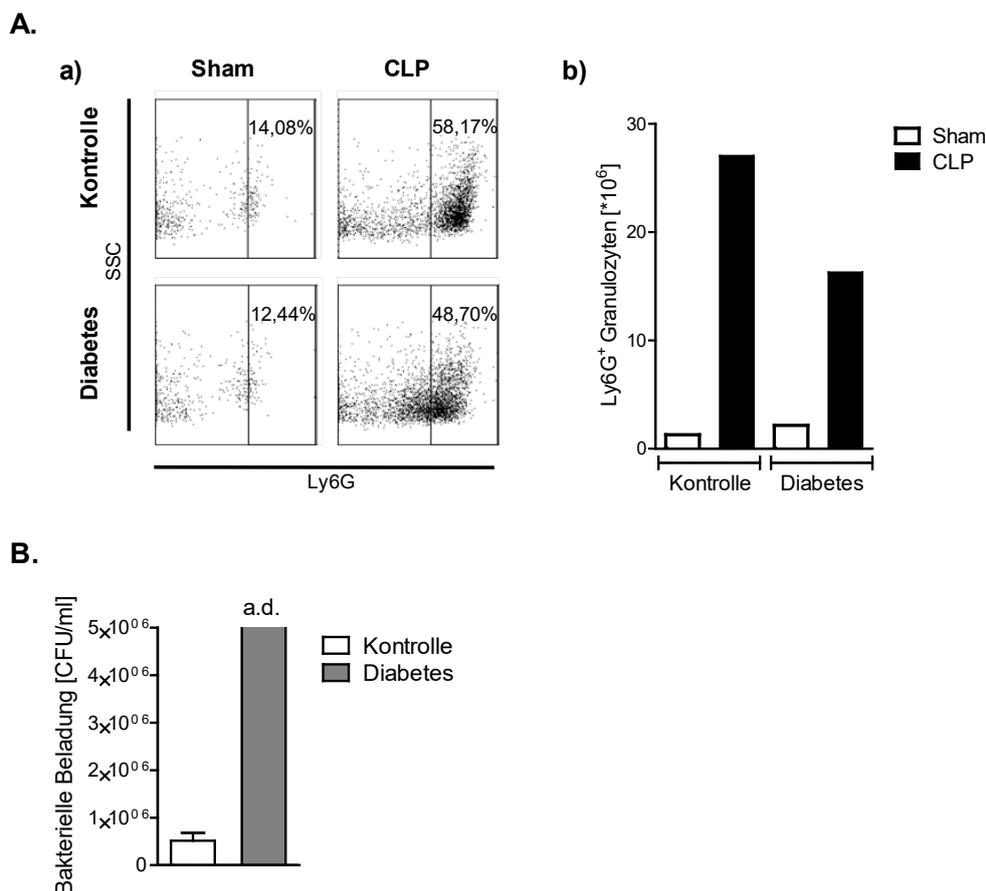


Abbildung 6: Induktion der Sepsis in Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen unter Verwendung des CLP-Modells. Fünfzehn Wochen nach Feststellung des Diabetes wurden diabetische Tiere oder Kontrolltiere einer CLP- oder Sham-Operation unterzogen. Vierundzwanzig Stunden nach der Operation wurden Zellen aus dem Peritoneum durch eine Lavage isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 6A: a) exemplarischer Dotplot, b) absolute Anzahl Granulozyten). Außerdem wurde die bakterielle Belastung in der Peritoneallavage durch einen Ausstrich auf Blutagarplatten und anschließende Zählung ermittelt (B). Die Balkendiagramme zeigen jeweils die Daten von n = 2-3 Tieren gepoolt (Abb. 6A b)) oder den Mittelwert mit Standardabweichung (Abb. 6B). a.d.= above detection limit

4.2.2 Einfluss des T1DM auf die Differenzierung der dendritischen Zellen während der Sepsis

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es durch eine Sepsis zu Veränderungen bei den DC kommt. So war zwar die Anzahl der aus dem Knochenmark generierten DC sowohl bei CLP-operierten Tieren als auch bei Sham-operierten Tieren gleich, jedoch unterschieden sich die DC in ihrer Eigenschaft bestimmte Zytokine zu produzieren. DC, die aus dem Knochenmark von CLP-operierten, also septischen Tieren, isoliert wurden,

sezernierten weniger proinflammatorisches IL-12 und mehr antiinflammatorisches IL-10 als die DC der Sham-operierten, also nicht septischen Tiere [76].

Um den Einfluss des T1DM auf die Differenzierung von DC während der Sepsis zu untersuchen, wurden die Zellen des Knochenmarks von diabetischen Tieren und Kontrolltieren 24 Stunden nach der Induktion der Sepsis isoliert und in Kultur mit GM-CSF gebracht, um eine Differenzierung zu DC zu gewährleisten. Nach acht bis neun Tagen wurden die DC geerntet, über Nacht mit CpG stimuliert und die Expression der Zytokine untersucht.

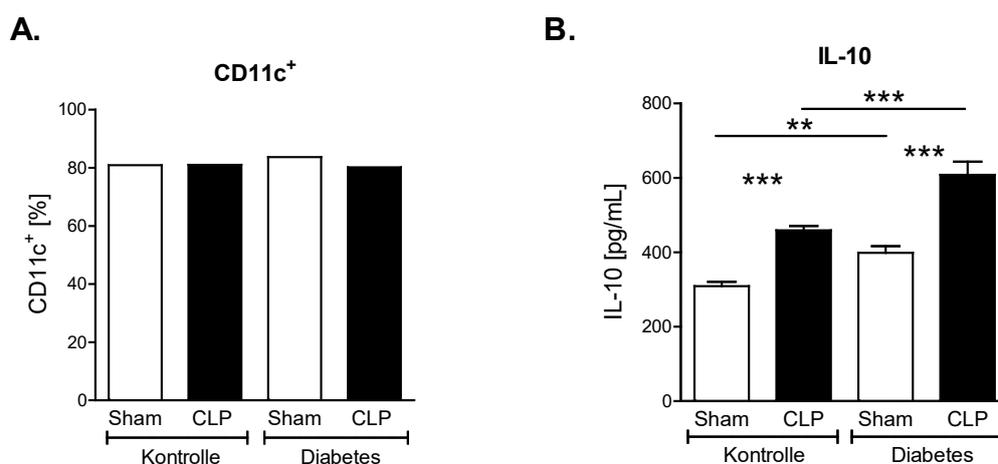


Abbildung 7: Charakterisierung der BMDC von Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen (nach CLP- oder Sham-Operation) in Kultur. Vierundzwanzig Stunden nach der CLP wurden die Knochenmarkszellen der diabetischen Tiere und Kontrolltiere entnommen, gruppenweise gepoolt und für neun Tage mit GM-CSF kultiviert. Sham-operierte Tiere dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie auf den prozentualen Anteil an CD11c⁺ Zellen (als Marker für DC) hin untersucht (A). Außerdem wurden die BMDC über Nacht mit CpG stimuliert und die Konzentration an IL-10 im Überstand mittels ELISA bestimmt (B). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Triplikate aus einem repräsentativen Experiment mit n = 1-4 Mäusen. Statistische Unterschiede wurden mittels "one way ANOVA" mit anschließendem Bonferroni Test bestimmt. ** p < 0,01, *** p < 0,001

Während der Anteil der CD11c⁺ DC bei allen untersuchten Gruppen nahezu identisch war und bei etwa 80 Prozent lag (Abbildung 7A), zeigten sich bei der Menge des von den BMDC produzierten IL-10 nach Stimulation mit CpG große Unterschiede (Abbildung 7B). So war die Konzentration bei den septischen Tieren der Kontrollgruppe signifikant höher als bei den nicht septischen Tieren der Kontrollgruppe. Auch bei den septischen Tieren der Diabetesgruppe war die Konzentration signifikant höher als bei den nicht septischen Tieren dieser Gruppe. Auffällig war außerdem, dass die Konzentration an IL-10 bei den diabetischen Tieren sowohl bei den Sham-operierten Tieren als auch bei den CLP-operierten Tieren signifikant höher war als bei den jeweiligen Tieren der Kontrollgruppe.

T1DM begünstigte somit die Differenzierung von dysfunktionalen DC mit einer erhöhten IL-10 Produktion. Dabei wurde das Ausmaß dieser Dysfunktion durch die Sepsis noch verstärkt.

4.3 Auswirkungen des T1DM auf die Zytokinproduktion *de novo* generierter dendritischer Zellen

Die Versuche unter Verwendung des CLP-Modells zeigten, dass T1DM bereits für sich die Differenzierung dysfunktionaler DC begünstigte. Um jedoch einen möglichen Einfluss der Sham-Operation auszuschließen, wurde in einem weiteren Schritt die IL-10 Produktion der BMDC diabetischer Tiere ohne vorangegangene Operation untersucht. Dazu wurde T1DM in C57BL/6-Mäusen induziert. Acht Wochen nach der Induktion des Diabetes wurden die Zellen aus dem Knochenmark der diabetischen Tiere isoliert und mit GM-CSF in Kultur gebracht. Nach acht bis neun Tagen wurden die DC geerntet, mit CpG oder LPS stimuliert und die Zytokinkonzentration im Überstand bestimmt.

Acht Wochen nach der Induktion des Diabetes zeigten die neu generierten DC der diabetischen Tiere sowohl nach der Stimulation mit CpG als auch nach der Stimulation mit LPS eine signifikant höhere Expression an IL-10 als die nicht diabetischen Kontrolltiere.

Dies bestätigte, dass T1DM bereits für sich die Differenzierung dysfunktionaler DC begünstigte.

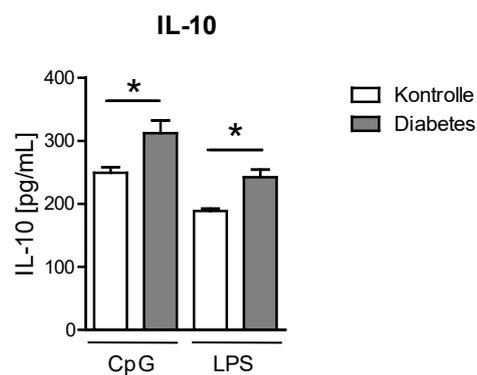


Abbildung 8: IL-10 Produktion der BMDC von Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen in Kultur. Acht Wochen nach der Induktion des Diabetes wurden die Knochenmarkszellen der diabetischen Tiere und Kontrolltiere entnommen, gruppenweise gepoolt und für neun Tage mit GM-CSF kultiviert. Mit Citratpuffer behandelte Tiere dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen geerntet, über Nacht mit CpG oder LPS stimuliert und die Konzentration an IL-10 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Triplikate aus einem repräsentativen Experiment mit $n = 3-4$ Mäusen. Statistische Unterschiede wurden mittels ungepaartem "student t-Test" analysiert. * $p < 0,1$

4.4 Auswirkungen des T1DM auf die dendritischen Zellen in der Milz

Um die Auswirkungen des Diabetes auf die Funktion der DC *in vivo* zu untersuchen, wurde T1DM in fünf Wochen alten C57BL/6-Mäusen unter Verwendung des Low-Dose Streptozotocin Protokolls induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion des Diabetes die DC aus der Milz der nicht diabetischen Kontrolltiere und der diabetischen Mäuse mittels MACS-Separation isoliert. Anschließend wurden die DC über Nacht mit CpG stimuliert und die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Vier Wochen nach der Induktion des Diabetes war die Expression von IL-12 bei den DC der diabetischen Tiere mit durchschnittlich 40 pg/ml bereits signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 67 pg/ml (Abbildung 9A). Dieser Unterschied wurde acht Wochen nach der Induktion des Diabetes noch deutlicher. Während die Konzentration des IL-12 bei den Kontrolltieren hier bei 72 pg/ml lag, erreichte die Konzentration des IL-12 bei den DC der diabetischen Tiere nur 31 pg/ml. Fünfzehn Wochen nach der Induktion des Diabetes war der Unterschied noch stärker ausgeprägt. Hier lag die Konzentration des IL-12 bei den DC der Kontrolltiere mit durchschnittlich 70 pg/ml in einem ähnlichen Bereich wie nach vier und acht Wochen. Bei den DC der diabetischen Tiere lag die Konzentration mit 14 pg/ml deutlich niedriger als bei den DC der Kontrollgruppe. Während die Werte der IL-12 Konzentration der DC der Kontrollgruppe zu allen drei Zeitpunkten in einem ähnlichen Bereich von ca. 70 pg/ml lagen, sank die Produktion an IL-12 bei den DC der diabetischen Tiere mit Fortschreiten des Diabetes.

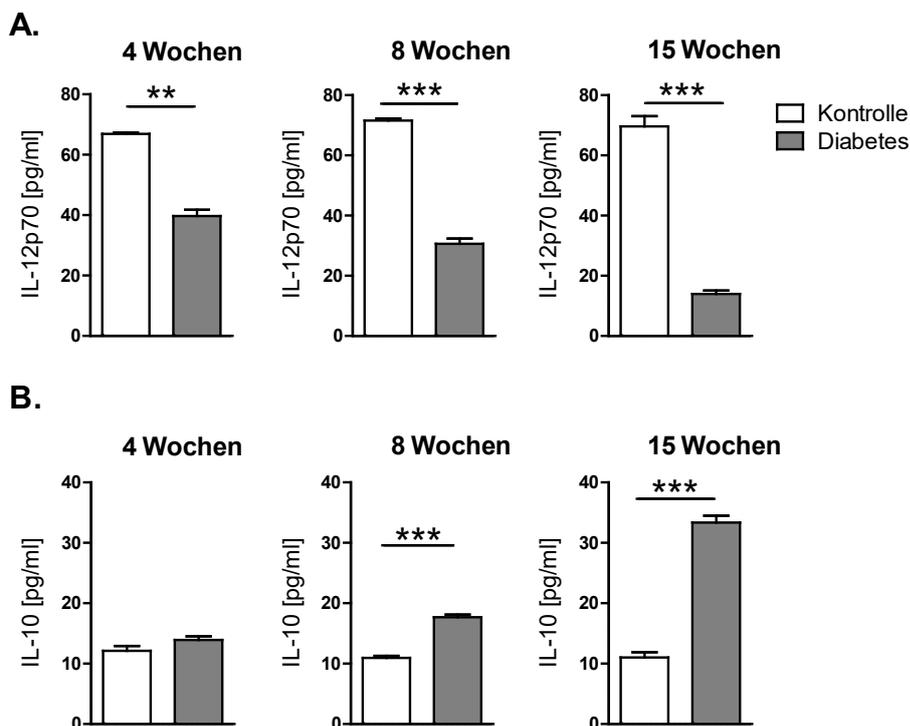


Abbildung 9: Analyse der Zytokinproduktion der DC isoliert aus der Milz von Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion des Diabetes wurden die DC aus der Milz der Kontroll- und Diabetestiere mittels MACS isoliert und über Nacht mit CpG stimuliert. Für die Kultur wurden die Zellen von $n = 1-3$ Tieren gepoolt. Anschließend wurde die Zytokinproduktion unter Verwendung des Cytometric Bead Array (CBA, BD) und der Durchflusszytometrie bestimmt. (A) IL-12p70 (B) IL-10. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten von einem repräsentativen Experiment. Statistische Unterschiede wurden mittels ungepaartem "student t-Test" analysiert. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Betrachtet man die Produktion an IL-10 (Abbildung 9B), so waren vier Wochen nach Induktion des Diabetes noch keine größeren Unterschiede zwischen den DC der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 12 pg/ml und den DC der diabetischen Tiere mit

durchschnittlich 14 pg/ml zu erkennen. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes war ein signifikanter Anstieg der IL-10 Konzentration bei den DC der diabetischen Tiere zu erkennen. Dabei lag die Konzentration an IL-10 bei den DC der Kontrollgruppe bei 11 pg/ml und erreichte bei den DC der diabetischen Tiere 18 pg/ml. Dieser Unterschied war 15 Wochen nach Induktion des Diabetes noch ausgeprägter. Hier lag die IL-10 Konzentration bei den DC der Kontrollgruppe weiterhin bei 11 pg/ml während die Konzentration bei den DC der diabetischen Tiere einen Wert von durchschnittlich 33 pg/ml erreichte.

Während die Konzentration des IL-10 bei den DC der Kontrollgruppe zu allen drei Zeitpunkten konstant bei ca. 11 pg/ml lag, stieg die Konzentration des IL-10 bei den DC der diabetischen Tiere mit Fortschreiten des Diabetes deutlich an und erreichte 15 Wochen nach Induktion des Diabetes einen dreifach höheren Wert als bei den DC der Kontrollgruppe.

T1DM führte also zu einer veränderten Zytokinproduktion der aus der Milz isolierten DC der diabetischen Tiere. Diese produzierten nach Stimulation mit CpG geringere Mengen an proinflammatorischen IL-12 und größere Mengen des antiinflammatorischen IL-10. Der Unterschied zu den Kontrolltieren war dabei umso stärker ausgeprägt je weiter die Erkrankung fortgeschritten war.

4.5 Einfluss der T-Zellen diabetischer Tiere auf *naive* dendritische Zellen *in vitro*

Die T-Zellen spielen bei der Entstehung des T1DM eine entscheidende Rolle, da sie in einer Autoimmunreaktion die β -Zellen des Pankreas angreifen und zerstören. Darüber hinaus können sie jedoch auch Einfluss auf andere Zellen des Immunsystems haben und diese wiederum in ihrer Funktion verändern. Zu diesen Zellen gehören unter anderem die DC. Dabei können die T-Zellen zum einen direkt auf die bereits differenzierten DC wirken [60], zum anderen können sie die DC indirekt beeinflussen, indem sie auf die Progenitorzellen der DC im Knochenmark wirken und so Einfluss auf deren Differenzierung nehmen [8].

Um einen möglichen direkten Einfluss der T-Zellen der diabetischen Tiere auf ausdifferenzierte DC zu überprüfen, wurden Knochenmarkszellen aus naiven Mäusen isoliert und für acht bis neun Tage mit GM-CSF kultiviert, um die Differenzierung zu BMDC zu gewährleisten. Anschließend wurden die BMDC geerntet und zusammen mit $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen aus diabetischen Tieren kultiviert, über Nacht mit CpG stimuliert und anschließend die Zytokinkonzentration im Überstand bestimmt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit T-Zellen, die aus Tieren isoliert wurden, die nur mit dem Citratpuffer (Lösungsmittel für Streptozotocin) behandelt wurden sowie BMDC, die ohne T-Zellen kultiviert und ebenfalls mit CpG stimuliert wurden.

Die Konzentration an IL-12 stieg signifikant an, wenn die BMDC mit $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen der Kontrolltiere kultiviert wurden (Abbildung 10A). Dabei war dieser Effekt bei den

BMDC, die mit den CD8⁺ T-Zellen kultiviert wurden mit 460 pg/ml noch einmal deutlich ausgeprägter als bei den BMDC, die mit den CD4⁺ T-Zellen kultiviert wurden. Hier lag die Konzentration bei 360 pg/ml. Wurden die BMDC hingegen mit CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere kultiviert, so war kein signifikanter Anstieg der IL-12 Konzentration zu erkennen und die Werte lagen hier sogar in einem ähnlichen Bereich wie die der BMDC, die ohne T-Zellen kultiviert wurden.

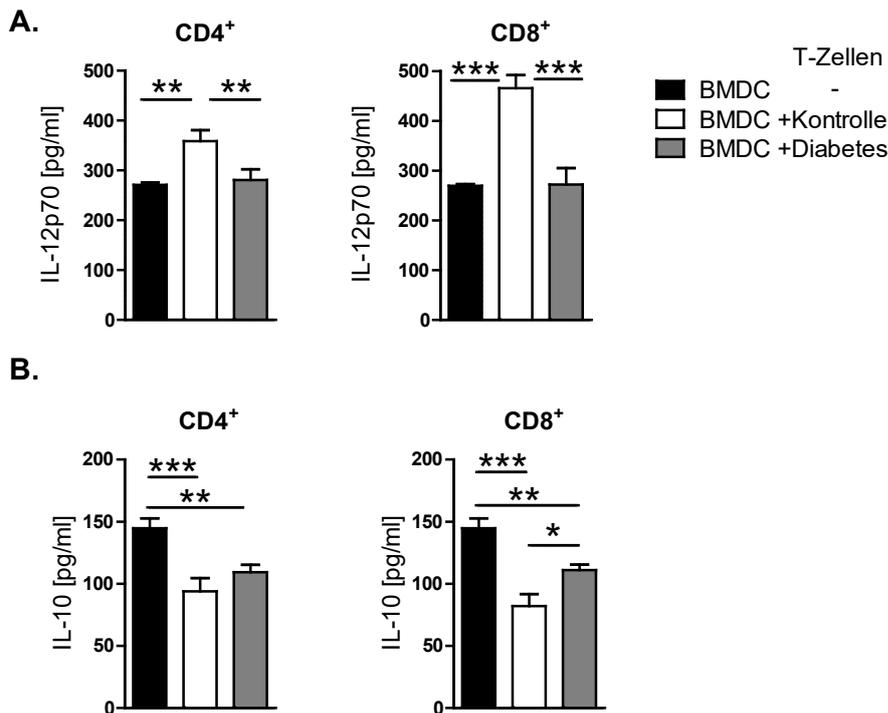


Abbildung 10: Zytokinproduktion naiver BMDC nach Co-Kultur mit T-Zellen isoliert aus der Milz von Kontrolltieren oder diabetischen C57BL/6-Mäusen. Naive BMDC wurden geerntet und anschließend mit CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, die mittels MACS aus der Milz von diabetischen oder Kontrollmäusen aufgereinigt wurden, in Kultur gebracht. Dabei wurden die T-Zellen von n = 3-4 Tieren pro Gruppe gepoolt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit CpG stimuliert und die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe der "one-way ANNOVA" mit anschließendem Bonferroni Test bestimmt. * p < 0,05, ** p < 0,01

Die Konzentration an IL-10 hingegen war, im Vergleich zu den BMDC, die in Abwesenheit von T-Zellen kultiviert wurden, signifikant niedriger, wenn die BMDC mit CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen der Kontrolltiere oder diabetischen Tiere kultiviert wurden. Jedoch war die Konzentration an IL-10 bei den Ansätzen mit den T-Zellen der diabetischen Tiere höher als bei den Ansätzen mit den T-Zellen der Kontrolltiere. Bei den Kulturen mit den CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere war dieser Unterschied signifikant.

T-Zellen isoliert aus T1DM Mäusen beeinflussten somit BMDC *in vitro* und führten, im Gegensatz zu den T-Zellen naiver Tiere, zu einer verminderten Produktion des proinflammatorischen IL-12 und einer erhöhten Produktion des antiinflammatorischen IL-10.

4.6 Einfluss der CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere auf die Differenzierung dendritischer Zellen *in vivo* - das NMRI-Foxn1^{nu}-Transfermodell

Die Ergebnisse zeigen, dass die dendritischen Zellen, isoliert aus der Milz diabetischer Mäuse, ein verändertes Zytokinprofil aufwiesen (s.4.4). Auch *in vitro* generierte BMDC naiver Tiere, die in Anwesenheit von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere kultiviert wurden, zeigten dieses veränderte Zytokinprofil. Dabei war der Unterschied zur Kontrollgruppe bei den BMDC, die mit CD8⁺ T-Zellen kultiviert wurden noch ausgeprägter als bei den BMDC, die mit CD4⁺ T-Zellen kultiviert wurden (s.4.5). CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere hatten somit einen Einfluss auf die DC.

Um zu überprüfen, ob CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere bereits Einfluss auf die Differenzierung der dendritischen Zellen im Knochenmark haben, wurde T1DM in fünf Wochen alten NMRI-Mäusen unter Verwendung des Low-Dose Streptozotocin Protokolls induziert. Anschließend wurden die CD8⁺ T-Zellen aus diabetischen NMRI-Mäusen isoliert und in NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse transferiert. Bei diesem Mausstamm kommt es durch eine Mutation im Forkhead boxN1 (*Foxn1*) Gen (Chromosom 11) zu einer Aplasie des Thymus. Dies hat zur Folge, dass die Tiere keine T-Zellen besitzen, während die übrigen Immunzellen wie DC, NK-Zellen und B-Zellen unverändert sind. So lässt sich der Einfluss der transferierten T-Zellen auf andere Immunzellen wie die DC untersuchen. Als Kontrolle dienten Tiere, die nur mit Citratpuffer behandelt wurden und deren CD8⁺ T-Zellen ebenfalls isoliert und transferiert wurden, sowie Mäuse die nur PBS anstelle der T-Zellen intravenös erhielten.

4.6.1 Charakterisierung der T-Zellen während des T1DM in den NMRI-Spendertieren

Da der Einfluss der CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere auf die Differenzierung der DC im Knochenmark untersucht werden sollte, wurden zunächst die T-Zellen der diabetischen NMRI-Spendertiere sowie der nicht diabetischen Kontrolltiere in Milz und Knochenmark untersucht, um Unterschiede zwischen den T-Zellen der gesunden und der diabetischen Spendertiere festzustellen und um die später transferierten CD8⁺ T-Zellen weiter zu charakterisieren. Hierzu wurde die Verteilung der verschiedenen T-Zellpopulationen (CD4⁺ und CD8⁺) sowie der CD8⁺ Subpopulationen (T_N, T_{CM} und T_E) analysiert und die Aktivierbarkeit der CD8⁺ T-Zellen überprüft.

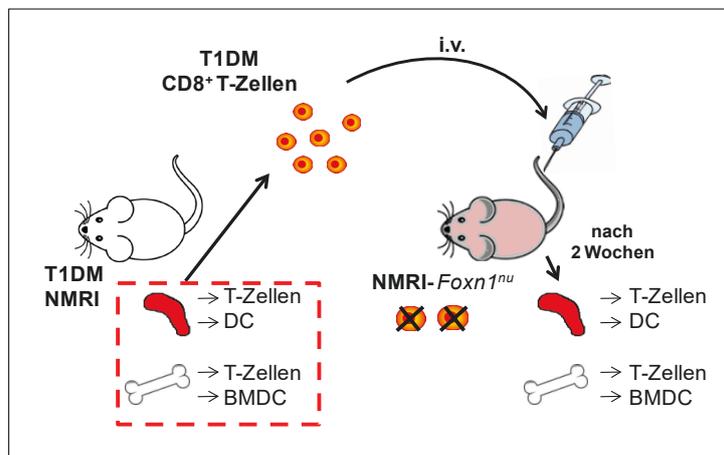


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Analyse der Zellen der Spendertiere. Diese Darstellung dient nur der besseren Orientierung, für eine detaillierte Beschreibung vgl. Abbildung 4, S. 28.

4.6.1.1 Verteilung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Milz und Knochenmark

Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in der Milz der diabetischen Tiere signifikant niedriger war als in der Milz der Kontrolltiere (Abbildung 12B). Dabei war dieser Unterschied bei den CD8⁺ T-Zellen noch ausgeprägter als bei den CD4⁺ T-Zellen. Im Knochenmark lag der prozentuale Anteil sowohl der CD4⁺ T-Zellen als auch der CD8⁺ T-Zellen unter einem Prozent. Dabei war der prozentuale Anteil beider T-Zellpopulationen bei den diabetischen Tieren signifikant höher als bei der Kontrollgruppe, wobei die Werte der einzelnen Tiere bei den diabetischen Mäusen jedoch stark schwankten. Die absolute Anzahl CD8⁺ T-Zellen in der Milz war bei den diabetischen Tieren signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren (Abbildung 12C). Auch bei der absoluten Anzahl CD4⁺ T-Zellen in der Milz war eine Tendenz von weniger CD4⁺ T-Zellen bei den diabetischen Tieren zu erkennen.

Im Knochenmark war die absolute Anzahl sowohl der CD4⁺ T-Zellen als auch der CD8⁺ T-Zellen bei den diabetischen Tieren signifikant erhöht.

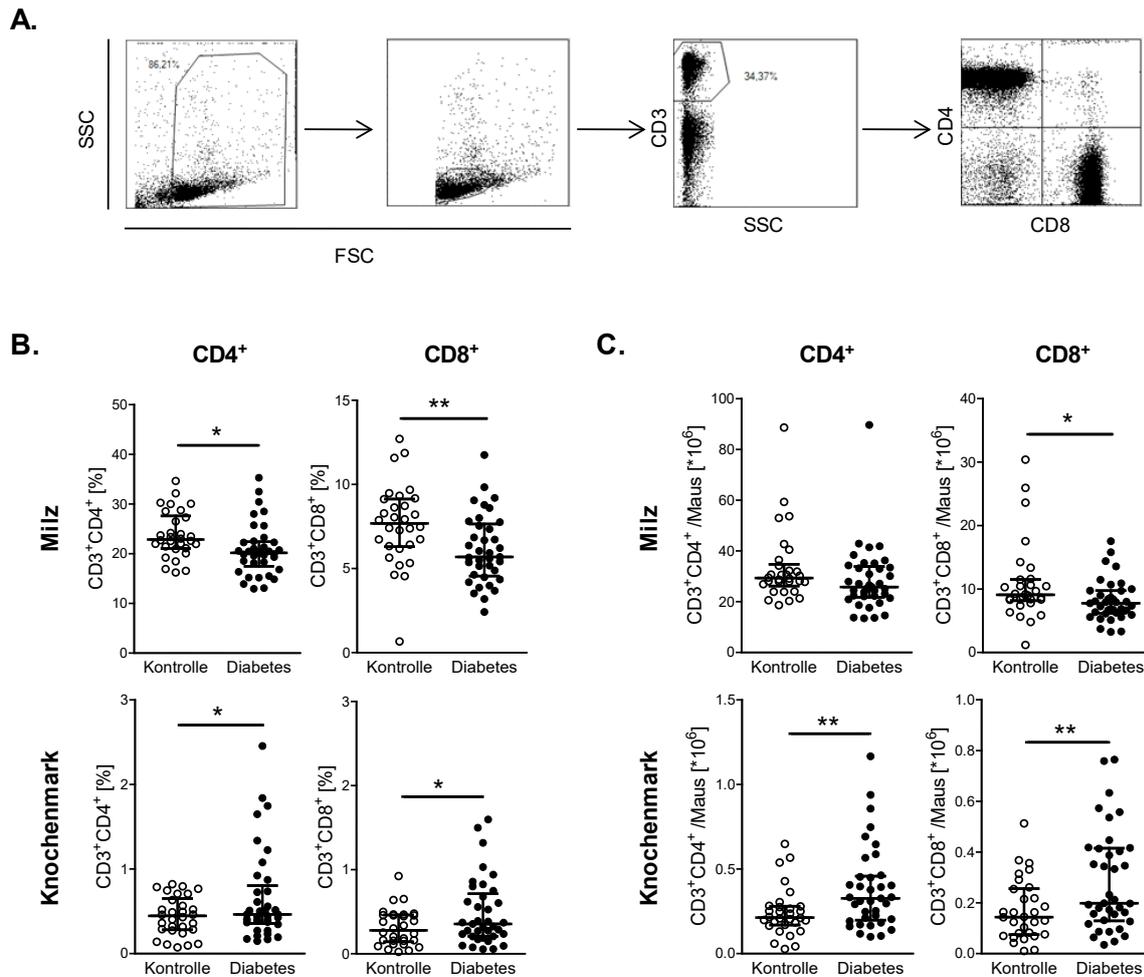


Abbildung 12: Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Milz und Knochenmark von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark der diabetischen Tiere und der Kontrolltiere isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihren Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hin untersucht. (A) Exemplarische Gatingstrategie, (B) prozentualer Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten, (C) absolute Zellzahl bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen aus Milz oder Knochenmark. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere aus fünf verschiedenen Versuchen mit Median und Interquartilsabstand mit $n = 6-9$ Mäuse. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten student t-Test analysiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Zusammengefasst kam es bei den diabetischen Tieren zu einem Verlust der T-Zellen in der Milz, während die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark anstieg.

4.6.1.2 Analyse der CD25 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Als CD25 wird die alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors bezeichnet. Es wird vor allem auf aktivierten T-Lymphozyten sowie konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen exprimiert. Um den Aktivierungszustand der T-Zellen in den diabetischen Tieren näher untersuchen zu können, wurden die isolierten T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

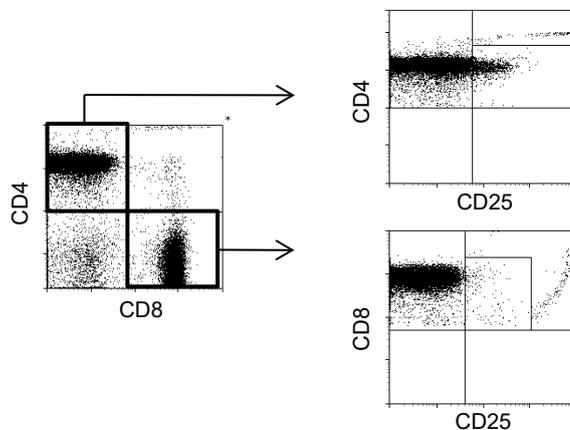
Betrachtet man den jeweiligen Anteil CD25⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen in Milz und Knochenmark (Abbildung 13B), so lag bei den diabetischen Tieren ein signifikanter Anstieg der CD25⁺ Zellen in der Milz vor, während im Knochenmark der Anteil CD25⁺ Zellen

bei der Diabetesgruppe in etwa dem Wert der Kontrollgruppe entsprach. Hinsichtlich des Anteils CD25⁺ Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen gab es sowohl in der Milz als auch im Knochenmark keinen Unterschied zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und den diabetischen Tieren.

Bei der absoluten Anzahl CD25⁺ T-Zellen in der Milz gab es sowohl bei den CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen als auch bei den CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den diabetischen Tieren (Abbildung 13C). Im Knochenmark der diabetischen Tiere war hingegen die Anzahl CD25⁺ T-Zellen signifikant erhöht. Dabei lag der Median der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen bei den diabetischen Tieren doppelt so hoch wie der Median der Kontrollgruppe. Auch die Anzahl CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen im Knochenmark war bei den diabetischen Tieren signifikant erhöht. Allerdings war die Gesamtzahl der CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen im Knochenmark sehr gering und schwankte vor allem bei den diabetischen Tieren sehr stark.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es zu einem signifikanten Anstieg sowohl CD4⁺ CD25⁺ als auch CD8⁺ CD25⁺ T-Zellen im Knochenmark der diabetischen Tiere kam, während sich die Anzahl der CD25⁺ T-Zellen in der Milz der diabetischen Tiere kaum von der Anzahl der nicht diabetischen Tiere unterschied.

A.



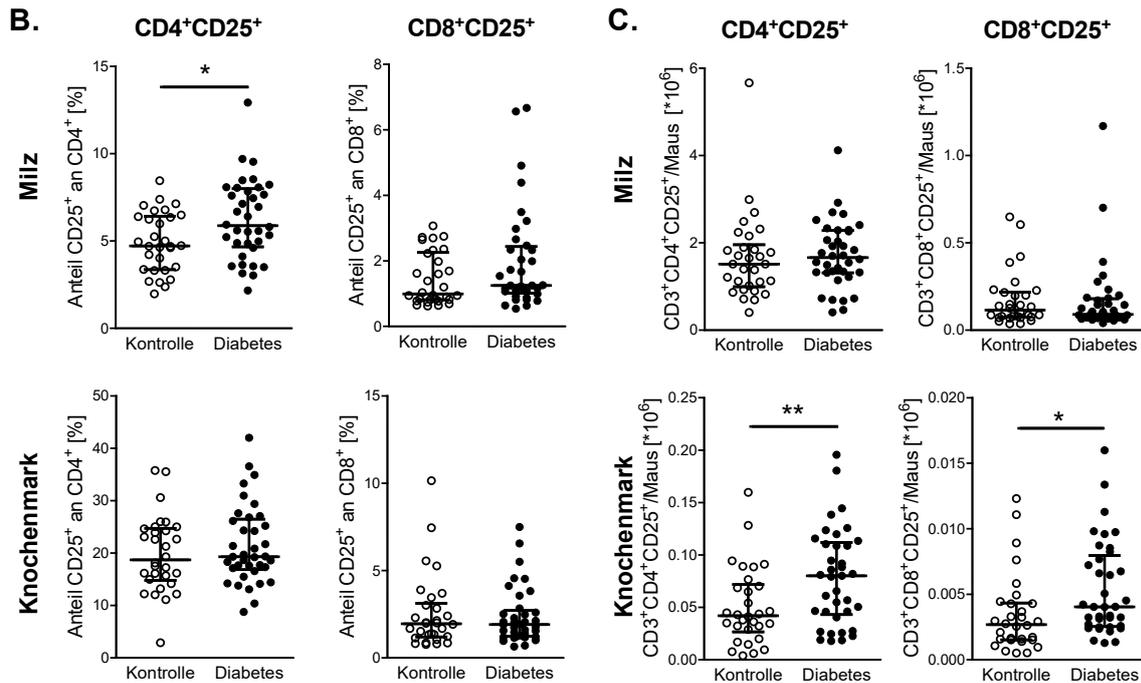


Abbildung 13: CD25 Expression der T-Zellen von Kontrolltieren oder diabetischen NMRI-Mäusen als Aktivitätsmarker. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark der diabetischen Tiere und der Kontrolltiere isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihren Anteil an $CD4^+CD25^+$ und $CD8^+CD25^+$ T-Zellen hin untersucht. (A) Exemplarische Gatingstrategie, (B) prozentualer Anteil der $CD25^+$ an der Gesamtzahl der $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, (C) absolute Zellzahl bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen aus Milz oder Knochenmark. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit Median und Interquartilsabstand aus fünf verschiedenen Versuchen mit $n = 6-9$ Mäuse. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten student t-Test analysiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.6.1.3 Analyse der T-Zell-Subpopulationen in Milz und Knochenmark der diabetischen Tiere

Die $CD8^+$ T-Zellen können anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker in weitere Untergruppen unterteilt werden. Dabei unterscheidet man naive T-Zellen (T_N), sie exprimieren $CD62L$ aber kein $CD44$, Central Memory T-Zellen (T_{CM}), sie exprimieren $CD62L$ und $CD44$, und Effektor T-Zellen (T_E), sie exprimieren $CD44$ aber kein $CD62L$.

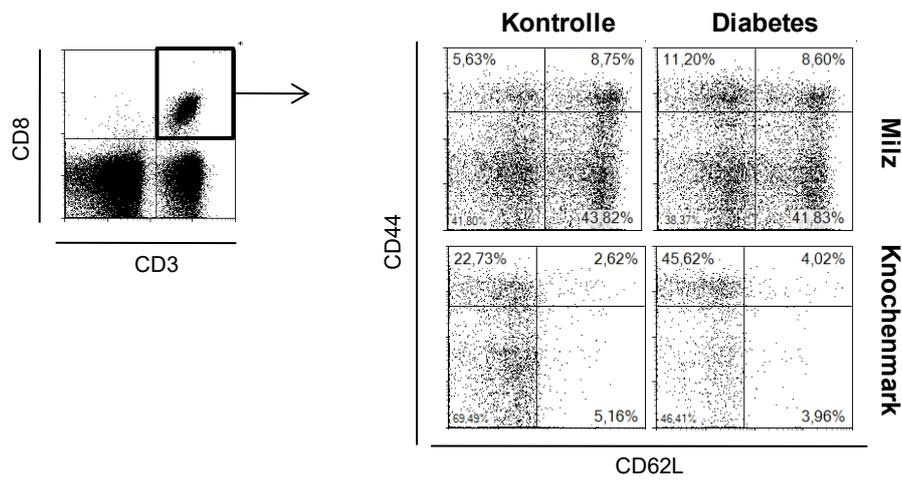
Um zu untersuchen, ob der Anstieg der Zellzahl der $CD8^+$ T-Zellen im Knochenmark der diabetischen Tiere auf die selektive Zunahme einer bestimmten Subpopulation der $CD8^+$ T-Zellen zurückzuführen war, wurden die Zellen der Milz und des Knochenmarks hinsichtlich einer Veränderung in der Expression dieser Oberflächenmarker analysiert.

Wie Abbildung 14B zeigt, war der prozentuale Anteil naiver T-Zellen in der Milz bei den diabetischen Tieren signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. Gleichzeitig war der prozentuale Anteil der Effektor T-Zellen bei den diabetischen Tieren signifikant erhöht. Der prozentuale Anteil an Central Memory T-Zellen war bei beiden Gruppen in etwa gleich. Allgemein hatten bei beiden Gruppen die naiven T-Zellen den größten prozentualen Anteil, wenn man die verschiedenen Subpopulationen verglich.

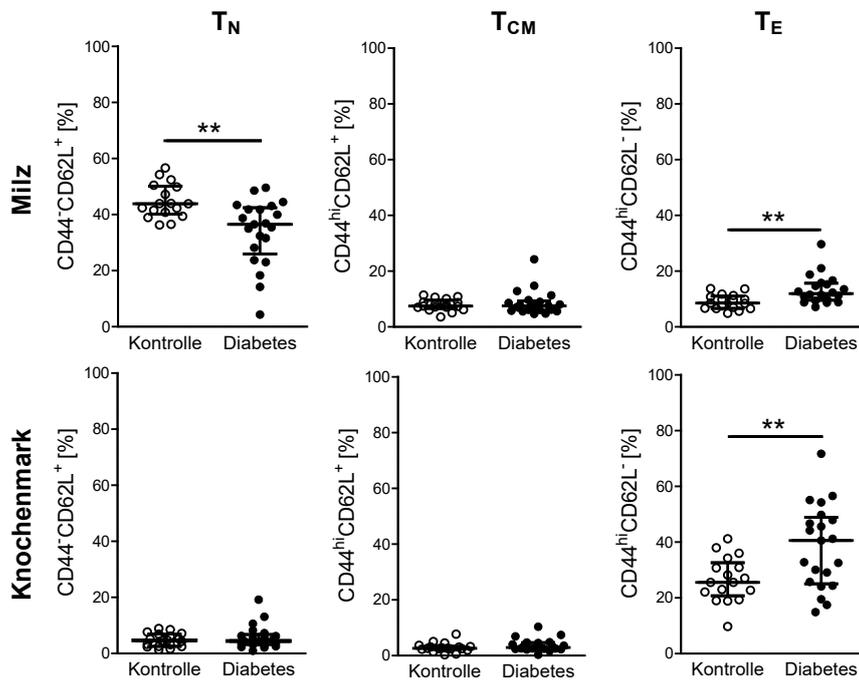
Die Zusammensetzung der verschiedenen Subpopulationen im Knochenmark unterschied sich von der in der Milz. Hier war der Anteil naiver T-Zellen deutlich niedriger und es gab

auch keine nennenswerten Unterschiede zwischen den diabetischen Tieren und der Kontrollgruppe. Auch der prozentuale Anteil an Central Memory T-Zellen war sehr gering und bei beiden Gruppen in etwa gleich. Den größten prozentualen Anteil CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark stellten in beiden Gruppen die Effektor T-Zellen, wobei der Anteil bei der Diabetesgruppe signifikant erhöht war im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

A.



B.



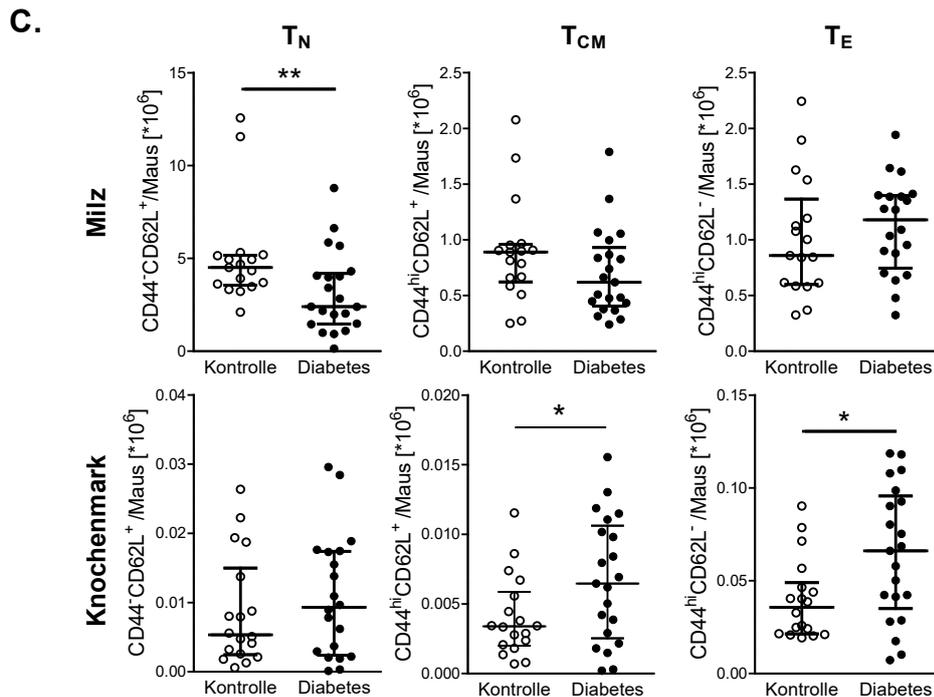


Abbildung 14: Zusammensetzung der CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen in Milz und Knochenmark von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark der diabetischen Tiere und der Kontrolltiere isoliert und mittels Durchflusszytometrie bezüglich der unterschiedlichen CD8⁺-Subpopulationen analysiert. Unter Anwendung der Gatingstrategie (A) wurde dabei in naive (T_N ; CD62L⁺CD44⁺), Central Memory (T_{CM} ; CD62L⁺CD44^{hi}) und Effektor (T_E ; CD62L⁻CD44^{hi}) CD8⁺ T-Zellen unterschieden. (B) Prozentualer Anteil der jeweiligen Subpopulation an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen. (C) Absolute Zellzahlen der Subpopulationen bezogen auf die errechnete Anzahl an CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit Median und Interquartilsabstand aus drei verschiedenen Versuchen mit $n = 6-9$ Mäuse. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten student t-Test analysiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Betrachtet man die absolute Anzahl naiver T-Zellen (Abbildung 14C) in der Milz, so besaßen die diabetischen Tiere signifikant weniger naive T-Zellen. Dabei war die Anzahl naiver T-Zellen bei den Tieren der Kontrollgruppe mit einem Median von 4,5 Millionen Zellen fast doppelt so hoch wie die der diabetischen Tiere mit nur 2,4 Millionen Zellen. Bei der Zahl der Central Memory T-Zellen war die Anzahl bei den diabetischen Tieren ebenfalls geringer als bei den Kontrolltieren. Die Anzahl der Effektor T-Zellen war hingegen bei den diabetischen Tieren tendenziell höher als bei den nicht diabetischen Kontrolltieren.

Im Knochenmark war bei der absoluten Anzahl naiver T-Zellen eine Tendenz zu mehr naiven T-Zellen bei den diabetischen Tieren zu erkennen. Auch bei den Central Memory T-Zellen kam es zu einem Anstieg bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe, der in diesem Fall signifikant war. Dabei lag der Median der diabetischen Tiere mit 6 600 Zellen doppelt so hoch wie der Median der Kontrollgruppe mit 3 300 Zellen. Allerdings war die allgemeine Anzahl an Central Memory T-Zellen im Knochenmark sehr gering. Die Anzahl der Effektor T-Zellen im Knochenmark war bei den diabetischen Tieren signifikant erhöht und der Median lag mit 66 000 Zellen fast doppelt so hoch wie bei der Kontrollgruppe mit 35 000 Zellen.

Während des T1DM kam es somit zu einem Verlust naiver T-Zellen in der Milz bei einem gleichzeitigen Anstieg der Anzahl der Effektor T-Zellen sowohl in der Milz als auch im Knochenmark.

4.6.1.4 Analyse der IFN- γ Expression der T-Zellen bei T1DM

Bei T1DM handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der die β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas von autoreaktiven T-Zellen angegriffen und zerstört werden. Dabei richtet sich die Reaktion der T-Zellen gegen verschiedene Autoantigene der β -Zellen, zu denen unter anderem die Glutamat Decarboxylase (GAD), ein peripheres Membranprotein der Mikrovesikel in den β -Zellen, gehört.

Der Anstieg der Anzahl an CD25⁺ T-Zellen (s. 4.6.1.2) sowie die erhöhte Anzahl von T_E und T_{CM} (s. 4.6.1.3) im Knochenmark der diabetischen Tiere könnte darauf hinweisen, dass bei den diabetischen Tieren eine antigenspezifische Immunantwort im Sinne der beschriebenen Autoimmunreaktion bei T1DM stattgefunden hat.

Um zu überprüfen, ob im Fall der diabetischen Tiere autoreaktive T-Zellen vorlagen und um die antigenspezifische Aktivierbarkeit der CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden die Milzzellen der diabetischen Tiere und der Kontrolltiere für 72 Stunden mit einem kommerziellen Peptidgemisch des GAD zur antigenspezifischen Stimulation von T-Zellen (PepTivator® GAD65, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) kultiviert und anschließend die IFN- γ Konzentration im Überstand bestimmt. Darüber hinaus wurden die Milzzellen antigenunspezifisch mit PMA und Ionomycin stimuliert, um die Auswirkungen des T1DM auf die allgemeine Aktivierbarkeit anhand der IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen.

Wie Abbildung 15A zeigt, war die IFN- γ Konzentration bei den Zellen der diabetischen Tiere auch schon höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe, wenn sie nur in Medium ohne GAD kultiviert wurden. Unter Zugabe von GAD stieg die IFN- γ Produktion der diabetischen Zellen leicht an, jedoch war dieser Anstieg auch bei den Zellen der Kontrollgruppe zu beobachten und nicht spezifisch für die Zellen der diabetischen Tiere.

Ein ähnliches Bild zeigte die Untersuchung der intrazellulären IFN- γ Expression mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 15B). Durch die Zugabe von BD GolgiStop™, einem Monensin enthaltenden Proteintransportinhibitor, der den intrazellulären Proteintransport in lymphoiden Zellen blockiert, kam es zu einer Akkumulation der produzierten Zytokine im Golgi-Komplex, die dann über eine intrazelluläre Färbung durchflusszytometrisch bestimmt werden konnten. Bei diesem Ansatz war die IFN- γ Expression bei den CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere ohne Zugabe von GAD bereits signifikant höher als bei den Zellen der Kontrollgruppe. Unter Zugabe der GAD-Peptide stieg die IFN- γ Expression bei den Zellen der diabetischen Tiere zwar leicht an, jedoch war dieser Anstieg auch bei den Zellen der Kontrolltiere zu beobachten und war hier signifikant. Betrachtet man nur die IFN- γ

Expression der CD44⁺ exprimierenden CD8⁺ T-Zellen, so lag auch hier die IFN- γ Expression der Zellen der diabetischen Tiere über der der Zellen der Kontrolltiere, wenn sie in Medium ohne GAD kultiviert wurden. Unter Zugabe von GAD stieg die IFN- γ Expression sowohl bei den Zellen der Kontrolltiere als auch bei den Zellen der diabetischen Tiere an. In diesem Fall war der Anstieg bei den Zellen der diabetischen Tiere signifikant.

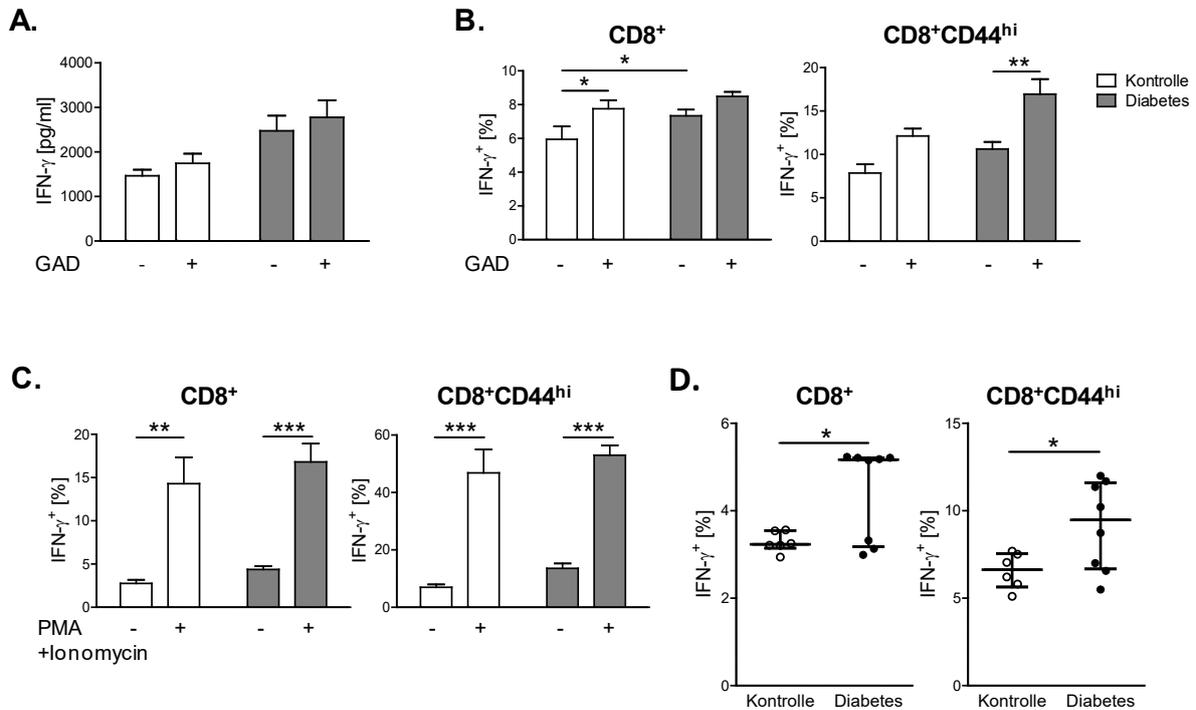


Abbildung 15: IFN- γ Expression der CD8⁺ T-Zellen diabetischer NMRI-Mäuse und Kontrolltiere. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurden die Milzzellen der diabetischen Mäuse und der Kontrollmäuse isoliert und in Kultur genommen. Dabei wurden sie entweder zusammen mit GAD für 2-3 Tage inkubiert und anschließend die IFN- γ Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen (A). Oder die Zellen wurden geerntet, mit Antikörpern gegen CD3 CD8 CD44 und IFN- γ gefärbt und die intrazelluläre IFN- γ Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt (B). Außerdem wurden Milzzellen von diabetischen Mäusen und Kontrollmäusen für vier Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert und anschließend die intrazelluläre IFN- γ Expression bestimmt (C). In einem weiteren Ansatz wurde die IFN- γ Expression *ex vivo* bestimmt (D). Dargestellt sind die Mittelwerte von $n = 3-9$ Mäusen pro Gruppe mit Standardfehler (A-C) oder die Einzelwerte der Tiere ($n = 6-8$ Mäuse pro Gruppe) mit Median und Interquartilsabstand (D). Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung der „one way ANOVA“ mit anschließendem Bonferroni Test (A-C) oder unter Verwendung des student t-Tests (D) berechnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$

Stimulierte man die isolierten Milzzellen der Kontrolltiere und der diabetischen Tiere antigenunspezifisch mit PMA und Ionomycin (Abbildung 15C), so war in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der IFN- γ Expression zu erkennen, wobei die Werte der diabetischen Tiere auch hier etwas höher lagen als die Werte der Kontrollgruppe. Betrachtet man hier die IFN- γ Expression der CD44⁺ Zellen, zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der IFN- γ Expression bei beiden Gruppen. Dabei lagen die Werte für die IFN- γ positiven Zellen hier mit 47 Prozent bei den Kontrolltieren und 53 Prozent bei den diabetischen Tieren sehr hoch. Es waren also vor allem die CD44⁺ T-Zellen, die auf die Stimulation mit der Produktion von IFN- γ reagieren.

Die IFN- γ Produktion war bei den Zellen der diabetischen Tiere bei allen Ansätzen bereits ohne zusätzliche Stimulation höher als bei den Zellen der Kontrolltiere. Dies könnte darauf hindeuten, dass die T-Zellen der diabetischen Tiere bereits im Tier konstitutiv IFN- γ produzierten. Um dies zu überprüfen, wurde die IFN- γ Produktion der T-Zellen *ex vivo* bestimmt. Dazu wurden in einem weiteren Versuch die Milzzellen isoliert und anschließend für acht Stunden unter Zugabe von BD GolgiStop™ in Kultur genommen (Abbildung 15D). Die Auswertung dieses Versuchsansatzes zeigte, dass der Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen bei den diabetischen Tieren bereits hier deutlich höher lag als bei den Zellen der Kontrollgruppe. Ebenso waren es vor allem die CD44⁺ Zellen, die IFN- γ exprimierten.

Die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere zeigten nach Stimulation den gleichen Anstieg in der IFN- γ Expression wie die CD8⁺ T-Zellen der nicht diabetischen Tiere. Darüber hinaus exprimierten die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere bereits *ex vivo* ohne vorherige Stimulation höhere Mengen an IFN- γ . Dabei waren es vor allem die CD8⁺ CD44^{hi} T-Zellen, die eine erhöhte IFN- γ Expression zeigten.

4.6.2 Charakterisierung der dendritischen Zellen während des T1DM in den NMRI-Spendertieren

Die Analyse der T-Zellen der diabetischen NMRI-Spendertiere zeigte, dass diese T-Zellen gewisse Veränderungen aufwiesen. So war die Anzahl CD25⁺ T-Zellen (Abbildung 13) sowie die Anzahl an T_E-Zellen (Abbildung 14) bei den diabetischen Tieren erhöht. Außerdem produzierten die T-Zellen der diabetischen Tiere *ex vivo* mehr IFN- γ (Abbildung 15). Ein Einfluss der T-Zellen der diabetischen Tiere auf die dendritischen Zellen wäre also denkbar. Um mögliche Veränderungen der DC der diabetischen Tiere festzustellen, wurden die DC aus Milz und Knochenmark der NMRI-Spendertiere analysiert.

4.6.2.1 Analyse der DC-Subpopulationen in der Milz während T1DM

Um eine mögliche direkte Auswirkung des T1DM auf die DC weiter zu untersuchen, wurden die Milzzellen von diabetischen und Kontrolltieren isoliert und auf das Vorkommen der DC-Subpopulationen hin untersucht.

Eine Analyse des prozentualen Anteils CD11⁺ Zellen in der Milz zeigte, dass der Anteil CD11c⁺ Zellen bei den diabetischen Tieren signifikant höher war, als bei den Tieren der Kontrollgruppe, wobei die Werte bei den diabetischen Tieren stark schwankten (Abbildung 16B). Die absolute Anzahl CD11⁺ Zellen war jedoch nicht wesentlich höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Auch die prozentualen Anteile der verschiedenen DC-Subpopulationen unterschieden sich bei den diabetischen Tieren und den Kontrolltieren nicht groß von einander (Abbildung 16). T1DM schien also keinen Einfluss auf die Differenzierung der DC-Subpopulationen zu haben.

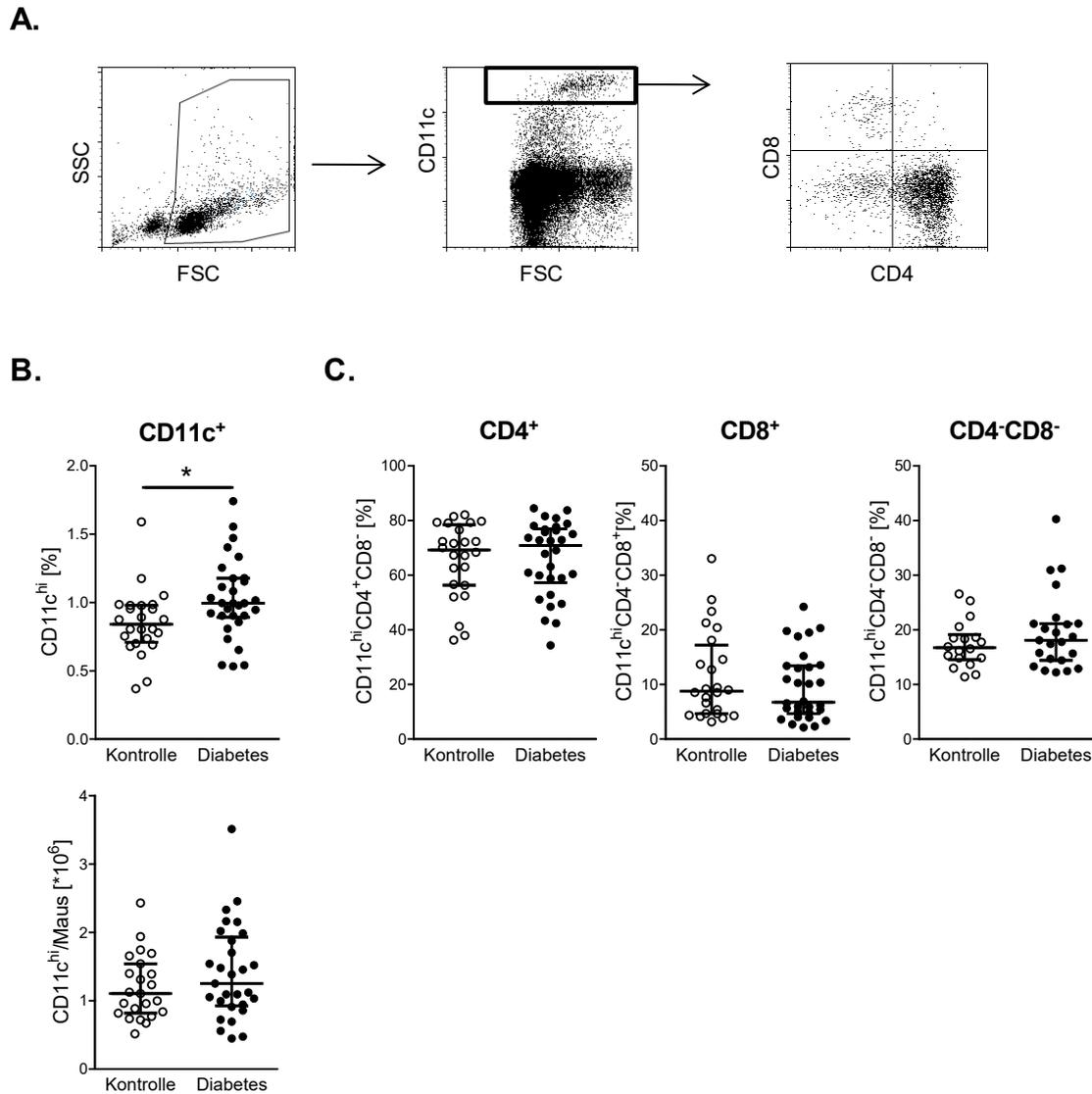


Abbildung 16: DC-Subpopulationen in der Milz der diabetischen NMRI-Mäuse und Kontrolltiere. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurden die Milzzellen der diabetischen Tiere und Kontrolltiere isoliert, mit Antikörpern gegen CD4 CD8 und CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Gatingstrategie. (B) a) Prozentualer Anteil CD11c^{hi} Zellen an der Gesamtzahl der Milzzellen, b) absolute Anzahl CD11c^{hi} positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Milzzellen. (C) Prozentualer Anteil CD4⁺, CD8⁺ und doppelt negativer CD4⁻CD8⁻ Zellen an der Zahl der CD11c^{hi} Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere aus vier Versuchen mit n = 6-9 Tieren pro Gruppe mit Median und Interquartilsabstand. Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung des Student t-Tests berechnet. * p < 0,05

4.6.2.2 Analyse des Aktivierungszustandes der DC in der Milz bei T1DM

Um weiter den Einfluss des Diabetes auf den Aktivierungszustand der DC zu untersuchen, wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 auf den aus der Milz isolierten DC mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie bereits gezeigt, war zwar der prozentuale Anteil sowie die absolute Anzahl der CD11c^{hi} DC in der Milz der diabetischen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Abbildung 16B), jedoch zeigten sich keine Unterschiede bei den prozentualen Anteilen der CD40⁺ oder CD86⁺ DC (Abbildung 17B). Die DC der diabetischen Tiere zeigten also keine Veränderung bezüglich ihres Aktivierungszustandes.

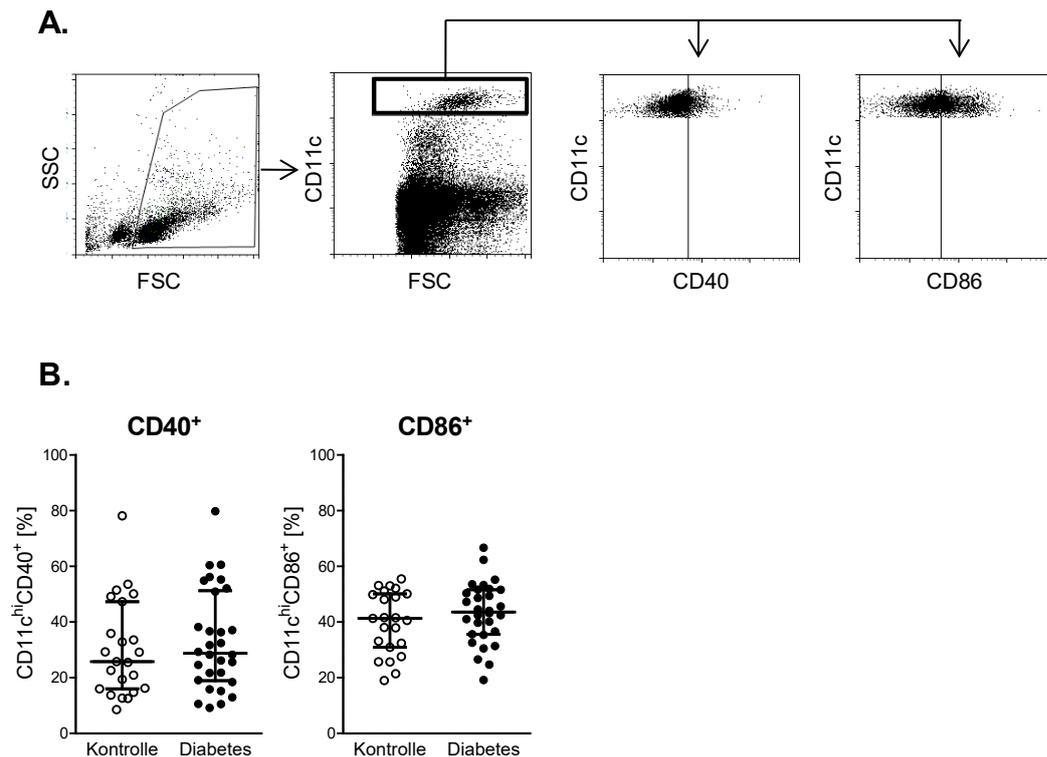


Abbildung 17: Analyse der CD40⁺ und CD86⁺ Expression der DC aus der Milz von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren als Marker für deren Aktivierung. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurden die Milzzellen der diabetischen Tiere und Kontrolltiere isoliert, mit Antikörpern gegen CD40 CD86 und CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Gatingstrategie. (B) Prozentualer Anteil CD40⁺ und CD86⁺ Zellen an der Zahl der CD11c⁺ Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere aus vier Versuchen mit n = 6-9 Tieren pro Gruppe mit Median und Interquartilsabstand.

4.6.2.3 Analyse des Aktivierungszustandes der BMDC bei T1DM

Um einen möglichen Einfluss des T1DM auf die Differenzierung *de novo* generierter DC zu untersuchen, wurden die Knochenmarkszellen von Kontrolltieren und diabetischen Tieren isoliert und mit GM-CSF kultiviert, um eine Differenzierung zu DC zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen geerntet und auf die Anzahl der DC sowie deren Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 hin untersucht. Außerdem wurden die Zellen über Nacht mit CpG oder LPS stimuliert, um die Aktivierbarkeit der DC zu prüfen, da es unter nicht pathologischen Bedingungen nach einer Stimulation zu einer Hochregulierung der CD40 und CD86 Expression auf den DC kommt.

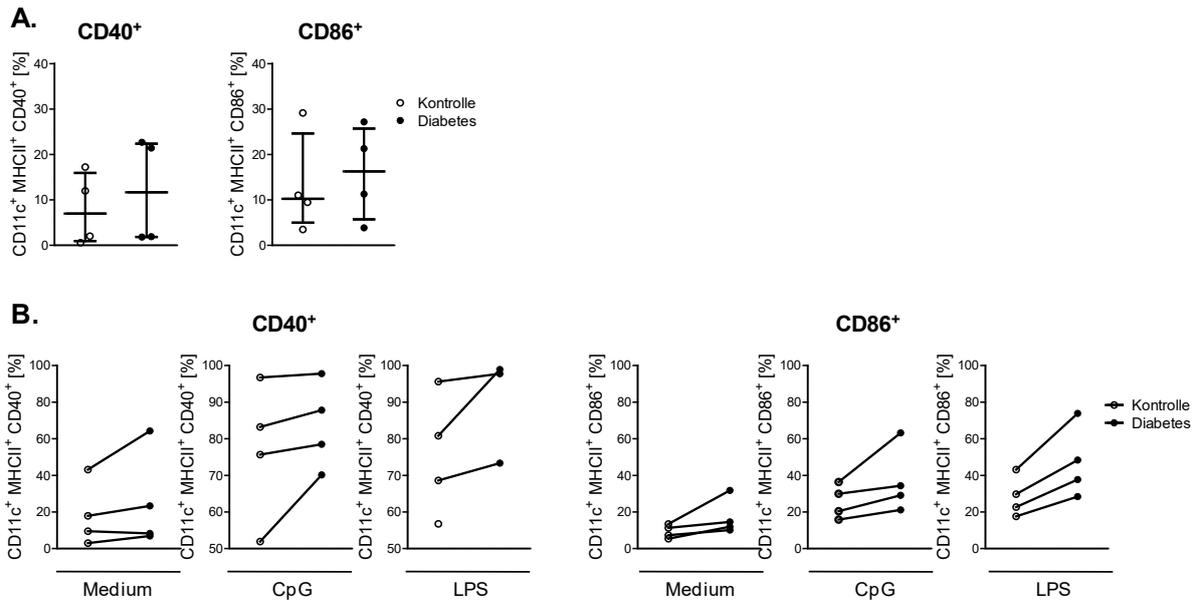


Abbildung 18: Analyse der CD40 und CD86 Expression der BMDC von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren als Marker für deren Aktivierung. Acht Wochen nach Induktion des Diabetes wurden die Knochenmarkszellen der diabetischen Tiere und Kontrolltiere isoliert, gruppenweise gepoolt und mit GM-CSF in Kultur genommen, um deren Differenzierung zu gewährleisten. An Tag 8-9 wurden die Zellen geerntet, mit Antikörpern gegen CD40 CD86 und CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil CD40⁺ und CD86⁺ positiver Zellen an der Zahl der CD11c⁺ Zellen (A). Außerdem wurden die BMDC über Nacht mit CpG oder LPS stimuliert und anschließend wiederum auf die Expression von CD40 und CD86 hin untersucht (B). Dargestellt sind der Median und Interquartilsabstand der jeweiligen Gruppen (A) und der Median der jeweiligen Gruppen (als Liniendiagramm, wobei jede Linie die Gruppen der einzelnen Experimente verbindet) (B) aus vier Versuchen mit n = 6-9 Tieren pro Gruppe.

Wie Abbildung 18A zeigt, schwankten die Werte der prozentualen Anteile CD40⁺ und CD86⁺ DC der einzelnen Versuche stark. Es war jedoch kein signifikanter Unterschied der CD40 und CD86 Expression zwischen der Kontrollgruppe und den diabetischen Tieren zu erkennen. Betrachtete man den prozentualen Anteil CD40⁺ und CD86⁺ DC nach der Übernachtkultur mit oder ohne Stimulation durch CpG oder LPS (Abbildung 18B), so fiel auf, dass der Anteil der DC, die CD40 exprimierten, bereits ohne Zugabe von Stimuli bei den diabetischen Tieren in nahezu allen Einzelversuchen tendenziell höher war als bei den Kontrolltieren. Auch der prozentuale Anteil CD86⁺ DC war bei den diabetischen Tieren in den Einzelversuchen tendenziell höher als bei den Kontrolltieren.

Nach der Stimulation mit CpG stieg der Anteil CD40⁺ DC deutlich an und lag für beide Gruppen, bis auf eine Ausnahme, zwischen 70 und 98 Prozent. Auch hier war der Anteil bei den diabetischen Tieren tendenziell höher als bei den Kontrolltieren. Der Anteil CD86⁺ DC stieg nach der Stimulation mit CpG ebenfalls an und lag für beide Gruppen, bis auf eine Ausnahme, zwischen 16 und 36 Prozent. Dabei lag der Anteil bei den diabetischen Tieren in den einzelnen Versuchen ebenfalls höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe.

Bei der Stimulation mit LPS stieg der prozentuale Anteil CD40⁺ DC ähnlich wie bei der Stimulation mit CpG, bis auf eine Ausnahme, auf Werte zwischen 69 und 99 Prozent für beide Gruppen. Dabei lagen die Werte der diabetischen Tiere in den einzelnen Versuchen

auch hier tendenziell höher als bei den Kontrolltieren. Auch der prozentuale Anteil CD86⁺ DC stieg unter der Stimulation mit LPS ähnlich wie bei der mit CpG, bis auf eine Ausnahme, auf Werte zwischen 18 und 48 Prozent für beide Gruppen. Allerdings lagen hier die Werte für die diabetischen Tiere mit 11 bis 30 Prozentpunkten in den einzelnen Experimenten deutlich über den Werten der Kontrollgruppe.

Die *de novo* generierten DC aus dem Knochenmark der diabetischen Tiere wiesen somit die Tendenz einer erhöhten Aktivierbarkeit gegenüber verschiedenen Stimuli auf.

4.6.3 Transfer naiver CD8⁺ T-Zellen zur Etablierung des Transferexperiments

Sollten die diabetischen CD8⁺ T-Zellen bereits Einfluss auf die Differenzierung der DC nehmen, so müssten diese nach dem Transfer auch im Knochenmark nachweisbar sein.

Zur Überprüfung des Versuchsansatzes wurden zunächst CD8⁺ T-Zellen aus der Milz naiver NMRI-Mäuse isoliert und in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse transferiert. Um feststellen zu können, in welchem Ausmaß die T-Zellen nach dem Transfer im Knochenmark erscheinen und um deren Expansion analysieren zu können, wurden die Zellen vor dem Transfer mit CFSE markiert.

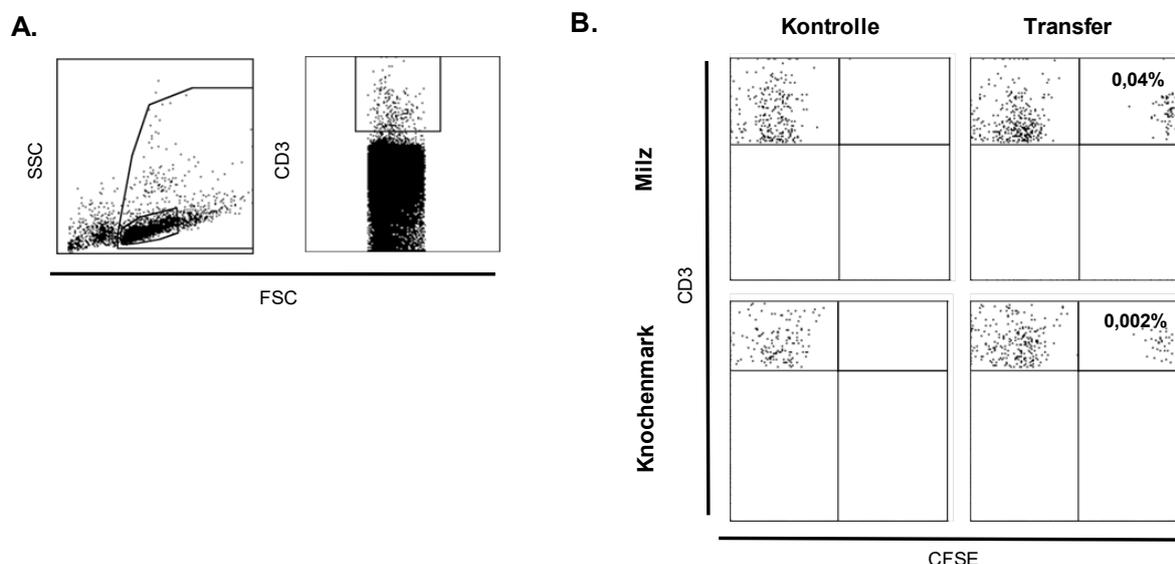


Abbildung 19: Transfer naiver CD8⁺ T-Zellen in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse. CD8⁺ T-Zellen wurden aus der Milz naiver NMRI-Mäuse mittels MACS isoliert, *in vitro* mit CFSE markiert und anschließend NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäusen intravenös appliziert. Als Kontrolle dienten Tiere, die nur PBS intravenös erhielten. Nach zwei Tagen wurden die Milz- und Knochenmarkszellen der Empfängertiere isoliert und unter Verwendung der Durchflusszytometrie auf das Erscheinen der CFSE markierten Zellen hin untersucht. (A) Gatingstrategie, (B) exemplarische dotplots für die Zellen in Milz und Knochenmark der Empfängertiere sowie der Kontrollen. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil bezogen auf die Zahl der lebenden Zellen (living cells, LC) an.

Bereits nach zwei Tagen waren CFSE positive Zellen sowohl in den Zellen der Milz als auch in den Zellen des Knochenmarks der Empfängertiere nachweisbar (Abbildung 19B). Der

prozentuale Anteil war mit 0,04 Prozent in der Milz und 0,002 Prozent im Knochenmark sehr gering. Bei den Kontrolltieren war kein CFSE-Signal nachweisbar.

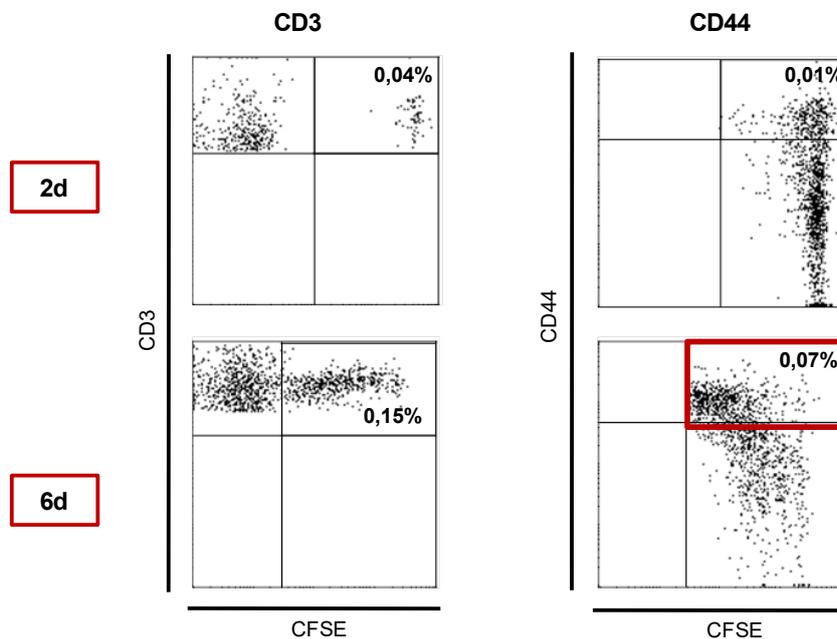


Abbildung 20: Proliferation naiver CD8⁺ T-Zellen nach Transfer in NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse. CD8⁺ T-Zellen wurden aus der Milz naiver NMRI-Mäuse mittels MACS isoliert, *in vitro* mit CFSE markiert und anschließend NMRI-Foxn1^{nu}-Mäusen intravenös appliziert. Nach zwei oder nach sechs Tagen wurden die Milzzellen der Empfängertiere isoliert, mit Antikörpern gegen CD3 und CD44 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil bezogen auf die Zahl der lebenden Zellen an.

Nach dem Transfer der CFSE markierten T-Zellen kam es während der nachfolgenden sechs Tage zu einer Proliferation dieser Zellen, was sich durch die Abnahme der Signalstärke CFSE positiver Zellen und den Anstieg des prozentualen Anteils CFSE positiver Zellen zeigte (Abbildung 20).

Die gleichzeitige Färbung der Zellen mit einem Antikörper gegen CD44 zeigte, dass es vor allem die CD44^{hi} CD8⁺ T-Zellen waren, die in die Milz und das Knochenmark einwanderten und proliferierten.

4.6.4 Analyse der Auswirkungen des CD8⁺ T-Zell-Transfers im Empfängertier

Um den Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Differenzierung der DC im Empfängertier zu untersuchen, wurden zwei Wochen nach dem Transfer die Zellen aus Milz und Knochenmark der Empfängertiere isoliert und sowohl die transferierten T-Zellen als auch die DC analysiert. Darüber hinaus wurden die Granulozyten aus dem Knochenmark der Empfängertiere untersucht. Da bereits bekannt ist, dass CD4⁺ T-Zellen einen Einfluss auf die Differenzierung der Granulozyten haben können und es nach dem Transfer CD4⁺ T-Zellen zu einem Anstieg der Granulozyten im Knochenmark kommt [67], könnte eine Veränderung in der Anzahl der Granulozyten im Knochenmark ein Hinweis auf einen möglichen Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Hämatopoese und somit auch auf die Differenzierung der DC sein.

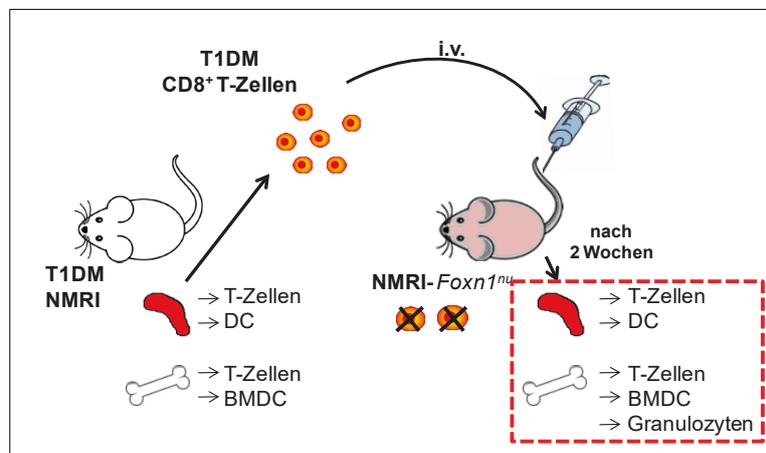


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Analyse der Zellen der Empfängertiere. Diese Abbildung dient der besseren Orientierung, für eine detaillierte Beschreibung vgl. Abbildung 4, S.28.

4.6.4.1 Auswirkung des CD8⁺ T-Zell-Transfers diabetischer und nicht diabetischer Tiere auf die Granulozyten im Knochenmark der NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse

Um zu überprüfen, ob der Transfer der CD8⁺ T-Zellen (ähnlich wie der Transfer CD4⁺ T-Zellen [67]) ebenfalls einen Einfluss auf die Granulozyten der NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse hat und ob es Unterschiede zwischen dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen der diabetischen und der nicht diabetischen Kontrolltiere gibt, wurden die Knochenmarkszellen der Empfängertiere zwei Wochen nach dem Transfer der T-Zellen isoliert, mit einem Antikörper gegen Ly6G als Marker für Granulozyten gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

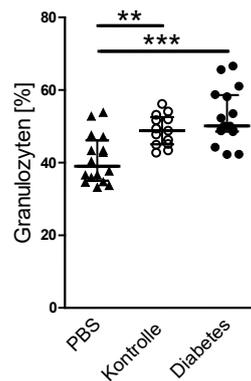


Abbildung 22: Anstieg der Granulozytenzahl im Knochenmark der Empfängertiere nach CD8⁺ T-Zell-Transfer. Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen von diabetischen NMRI-Mäusen oder Kontrolltieren in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse, wurden die Knochenmarkszellen der Empfängertiere isoliert, gegen Ly6G als Marker für Granulozyten gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle für den Transfer dienten NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse, die nur PBS anstelle der entsprechenden CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Ly6G⁺ Zellen an den gesamten Knochenmarkszellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit Median und Interquartilsabstand aus vier Versuchen mit n = 3-5 Mäusen. Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung der "one way ANOVA" mit anschließendem Bonferroni Test berechnet. ** p < 0,01, *** p < 0,01

Nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen kam es zu einem signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils der Granulozyten im Knochenmark der Empfängertiere verglichen mit der Anzahl der Granulozyten der Kontrollgruppe, die nur PBS erhalten hatte. Dabei lagen die Werte bei den Tieren, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, tendenziell noch etwas höher als bei den Tieren, die die T-Zellen der nicht diabetischen Tiere erhalten hatten.

CD8⁺ T-Zellen förderten somit die Bildung von Granulozyten im Knochenmark der Mäuse.

4.6.4.2 Charakterisierung der transferierten CD8⁺ T-Zellen aus diabetischen und nicht diabetischen Tieren nach Transfer in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse

Die zytotoxischen T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei T1DM, da sie die β -Zellen des Pankreas angreifen und zerstören. Außerdem produzieren die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere *ex vivo* mehr IFN- γ als die CD8⁺ T-Zellen der Kontrolltiere (s. 4.6.1.4).

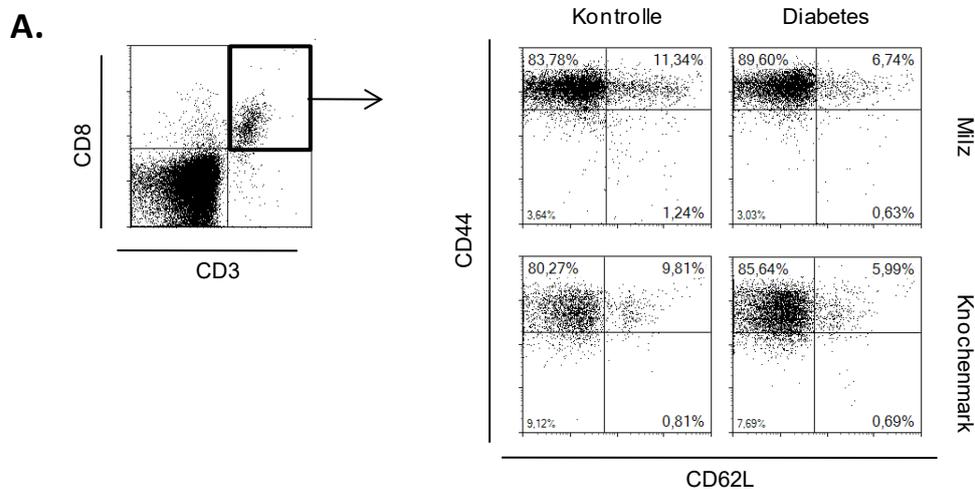
Um einen möglichen Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Differenzierung der DC zu überprüfen, wurden CD8⁺ T-Zellen aus Kontrolltieren und diabetischen Tieren isoliert und in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse transferiert.

Zwei Wochen nach dem Transfer wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark der Empfängertiere isoliert und hinsichtlich des Vorkommens der verschiedenen CD8⁺ T-Zellpopulationen untersucht. Wie Abbildung 23B zeigt, waren es vor allem CD8⁺ T-Effektorzellen, die sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den diabetischen Tieren in der Milz und im Knochenmark ankamen und mit über 80 Prozent in der Milz und mit 60 bis 90 Prozent im Knochenmark den größten Anteil CD8⁺ T-Zellen stellten. Dabei war der prozentuale Anteil in der Milz der diabetischen Tiere signifikant höher als der der

Kontrolltiere. Auch im Knochenmark war eine Tendenz zu einem höheren Anteil an CD8⁺ Effektorzellen bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erkennen, jedoch schwankten die Werte der einzelnen Tiere hier stärker.

Neben dem großen Anteil an CD8⁺ Effektorzellen kam auch noch ein kleiner Anteil an Memory T-Zellen sowohl in der Milz als auch im Knochenmark vor, der jedoch, mit überwiegend unter 20 Prozent, deutlich geringer war. Dabei war der prozentuale Anteil der T_{CM} in der Milz bei den diabetischen Tieren signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Auch im Knochenmark war eine Tendenz zu weniger T_{CM} bei den diabetischen Tieren zu erkennen. Der prozentuale Anteil naiver CD8⁺ T-Zellen lag sowohl in der Milz als auch im Knochenmark unter 3 Prozent und bildete somit den geringsten Anteil.

Betrachtet man die absolute Anzahl an CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 23C) in der Milz, so fällt auf, dass die Werte für die einzelnen Tiere bei allen drei Populationen sehr stark schwankten. Dabei gab es keinen Unterschied bei der Anzahl naiver T-Zellen in der Milz von Kontrolltieren und diabetischen Tieren. Auch bei der absoluten Anzahl an T_{CM} zeigte sich kein Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den diabetischen Tieren. Bei der absoluten Anzahl an Effektorzellen war eine Tendenz zu mehr T_E-Zellen bei den diabetischen Tieren zu erkennen.



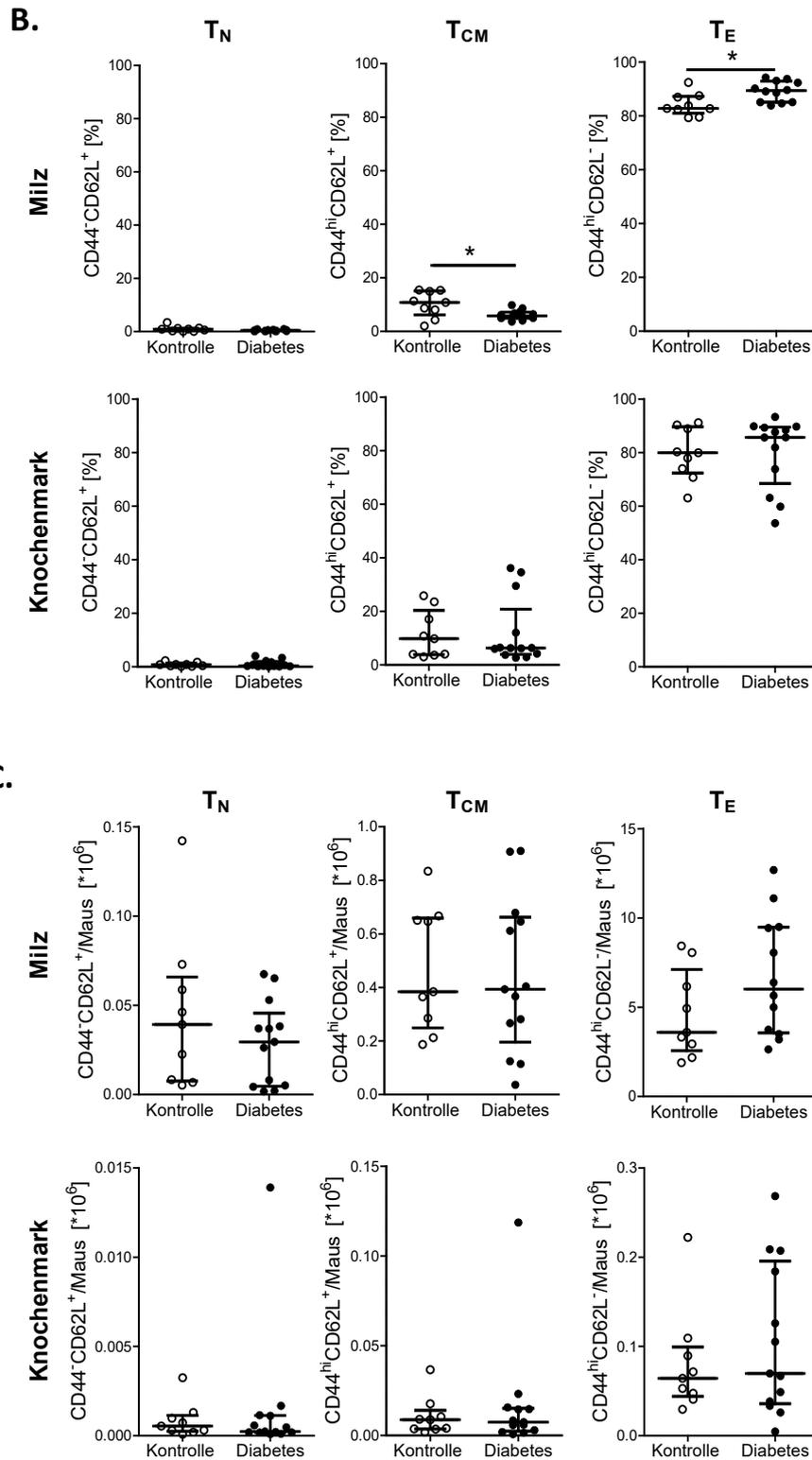


Abbildung 23: Zusammensetzung der CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen in Milz und Knochenmark der Empfängertiere nach CD8⁺ T-Zell-Transfer. Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen von diabetischen NMRI-Mäusen oder Kontrolltieren in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse, wurden die Zellen aus Milz und Knochenmark der Empfängertiere isoliert und mittels Durchflusszytometrie bezüglich der unterschiedlichen CD8⁺ Subpopulationen analysiert. Unter Anwendung der Gatingstrategie (A) wurde dabei in naive (T_N; CD62L⁺CD44⁻), Central Memory (T_{CM}; CD62L⁺CD44^{hi}) und Effektor (T_E; CD62L⁻CD44^{hi}) CD8⁺ T-Zellen unterschieden. (B) Prozentualer Anteil der jeweiligen Subpopulation an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen. (C) Absolute Zellzahlen der Subpopulationen bezogen auf die errechnete Anzahl an CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere mit Median und Interquartilsabstand aus drei verschiedenen Versuchen mit n = 6-9 Mäusen. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten student t-Test analysiert. * p < 0,05

Betrachtet man die CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark, gab es für keine der drei T-Zellpopulationen nennenswerte Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den diabetischen Tieren. Allerdings war die Anzahl an T-Zellen auch sehr gering. Den größten Anteil stellten dabei die Effektor T-Zellen mit einem Median von 60.000 Zellen bei den Kontrolltieren und 70.000 Zellen bei den diabetischen Tieren.

Die transferierten CD8⁺ T-Zellen differenzierten also hauptsächlich zu T_E-Zellen.

4.6.4.3 Analyse der DC-Subpopulationen in der Milz der NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse nach CD8⁺ T-Zell-Transfer

Um den Einfluss der transferierten CD8⁺ T-Zellen auf die dendritischen Zellen *in vivo* zu analysieren, wurden die Milzzellen der Kontrolltiere, die nur PBS erhalten hatten, sowie der Tiere, die CD8⁺ T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere oder der diabetischen Tiere erhalten hatten, auf die Anzahl der DC und die Zusammensetzung der Subpopulationen hin untersucht.

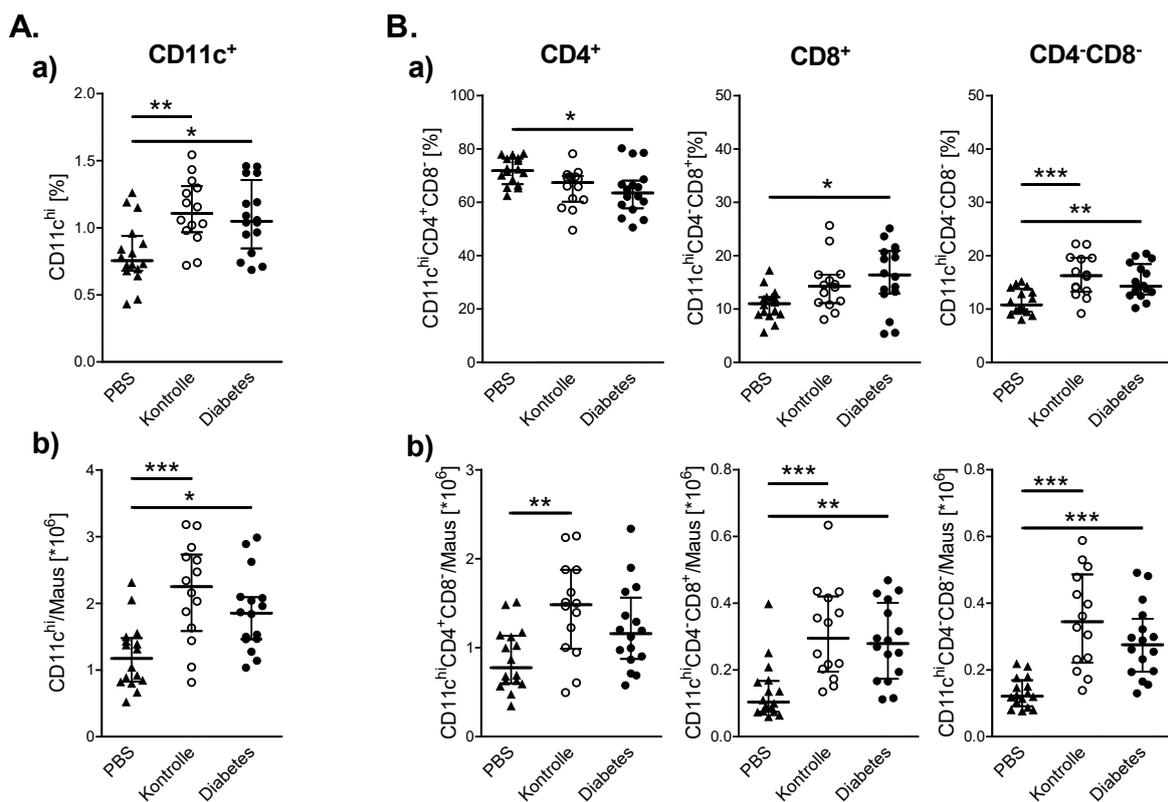


Abbildung 24: DC-Subpopulationen in der Milz der Empfängertiere nach CD8⁺ T-Zell-Transfer. Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen von diabetischen NMRI-Mäusen oder Kontrolltieren, wurden die Milzzellen der Empfängertiere isoliert, mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle für den Transfer dienten NMRI-*Foxn1^{nu}* Mäuse, die nur PBS anstelle der entsprechenden CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. (A) a) Prozentualer Anteil CD11c⁺ Zellen an der Gesamtzahl der Milzzellen, b) absolute Anzahl CD11c⁺ positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Milzzellen. (B) a) Prozentualer Anteil CD4⁺, CD8⁺ und doppelt negativer CD4⁻CD8⁻ Zellen an der Zahl CD11c⁺ Zellen, b) absolute Anzahl CD4⁺, CD8⁺ und doppelt negativer CD4⁻CD8⁻ Zellen bezogen auf die Zahl CD11c⁺ Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere aus vier Versuchen mit n = 6-9 Tieren pro Gruppe mit Median und Interquartilsabstand. Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung der one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Test berechnet. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,01

Wie Abbildung 24A zeigt, war sowohl der prozentuale Anteil als auch die absolute Anzahl an CD11c⁺ DC in der Milz der Tiere, die CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten, signifikant höher als bei den Kontrolltieren, die keine T-Zellen erhalten hatten. Dabei war der Anstieg bei den Tieren, die die CD8⁺ T-Zellen der nicht diabetischen Tiere erhalten hatten, noch einmal ausgeprägter als bei den Tieren, die die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten.

Betrachtete man die verschiedenen Subpopulationen der DC in der Milz der Empfängertiere, so fiel auf, dass der prozentuale Anteil der CD4⁺ DC nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen tendenziell niedriger war, während der Anteil sowohl der CD8⁺ als auch der CD4⁻ CD8⁻ höher war, als bei den Tieren, die nur PBS erhalten hatten.

Bei der absoluten Anzahl der Zellen der verschiedenen DC Subpopulationen kam es bei den CD4⁺ DC ebenso wie bei den CD8⁺ und der doppelt negativen CD4⁻ CD8⁻ DC zu einem Anstieg der Zellzahl, nachdem die Tiere CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. Dieser Anstieg fiel bei den Tieren, die die Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, tendenziell etwas schwächer aus als bei den Tieren, die die Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten. Dabei verdoppelte sich die Anzahl der CD4⁺ DC während sich die Anzahl der CD8⁺ sowie doppelt negativer CD4⁻ CD8⁻ DC verdreifachte.

Die transferierten CD8⁺ T-Zellen förderten die Generierung von DC im Knochenmark. Dabei war die Anzahl der DC bei den Tieren, die die Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten tendenziell etwas schwächer als bei den Tieren, die die Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten.

4.6.4.4 Analyse des Aktivierungszustandes der DC in der Milz der NMRI-Foxn1^{nu} - Mäuse nach CD8⁺ T-Zell-Transfer

Um den Einfluss der transferierten T-Zellen auf die Differenzierung der DC der Empfängertiere zu untersuchen, wurden die DC der Milz der Empfängertiere mittels Durchflusszytometrie auf ihre Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 hin untersucht.

Nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen kam es zu einem Anstieg des prozentualen Anteils an CD40⁺, CD86⁺ und doppelt positiven CD40⁺ CD86⁺ DC in der Milz der Empfängertiere. Dabei war der Anstieg der CD86⁺ und der doppelt positiven CD40⁺ CD86⁺ DC signifikant. Der Median für die CD40⁺ DC und doppelt positiven CD40⁺ CD86⁺ DC lag bei den Tieren, die die T-Zellen erhalten hatten, doppelt so hoch wie bei den Tieren, die PBS erhalten hatten. Bei den CD86⁺ DC lag der Median für die Tiere, die PBS erhalten hatten, bei 50 Prozent und bei den Tieren, die die T-Zellen erhalten hatten, bei 70 bzw. 73 Prozent. Auffällig war, dass die Werte der Einzeltiere besonders bei den CD40⁺ DC stark schwankten.

Der Transfer CD8⁺ T-Zellen in NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse führte also zu einem Anstieg der Expression kostimulatorischer Moleküle auf den DC der Empfängertiere. Dabei gab es keine

nennenswerten Unterschiede zwischen dem Transfer der T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere und der T-Zellen der diabetischen Tiere.

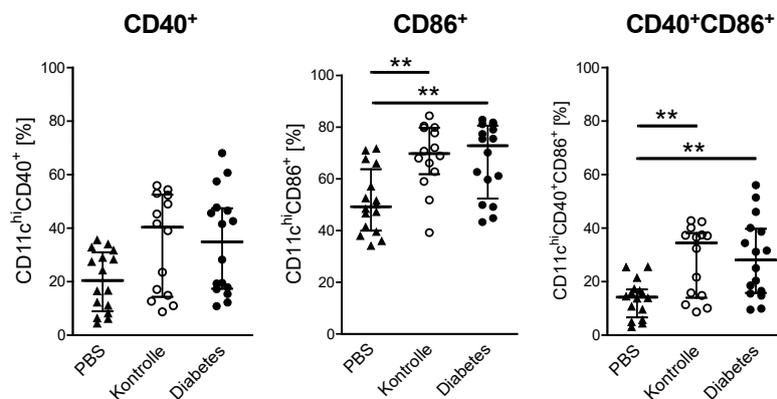


Abbildung 25: Analyse der CD40 und CD86 Expression der DC aus der Milz der Empfängertiere nach CD8⁺ T-Zell-Transfer. Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen von diabetischen NMRI-Mäusen oder Kontrolltieren, wurden die Milzzellen der Empfängertiere isoliert, mit Antikörpern gegen CD40, CD86 und CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Als Kontrolle für den Transfer dienten NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse, die nur PBS anstelle der entsprechenden CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil CD40⁺, CD86⁺ und doppelt positiver CD40⁺ CD86⁺ Zellen an der Zahl der CD11c⁺ Zellen. Dargestellt sind die Einzelwerte der Tiere aus vier Versuchen mit n = 6-9 Tieren pro Gruppe mit Median und Interquartilsabstand. Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung der one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Test berechnet. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,01

4.6.4.5 Analyse des Zytokinprofils der DC aus der Milz der NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse nach CD8⁺ T-Zell-Transfer

Um weiter die Möglichkeit eines direkten Einflusses der T-Zellen der diabetischen Tiere auf die DC *in vivo* zu untersuchen, wurden die DC aus der Milz der Empfängertiere mittels MACS-Separation isoliert und über Nacht mit CpG stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration verschiedener Zytokine im Überstand mit Hilfe des CBA oder ELISA bestimmt. Außerdem wurde eine intrazelluläre Färbung für IL-12 durchgeführt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

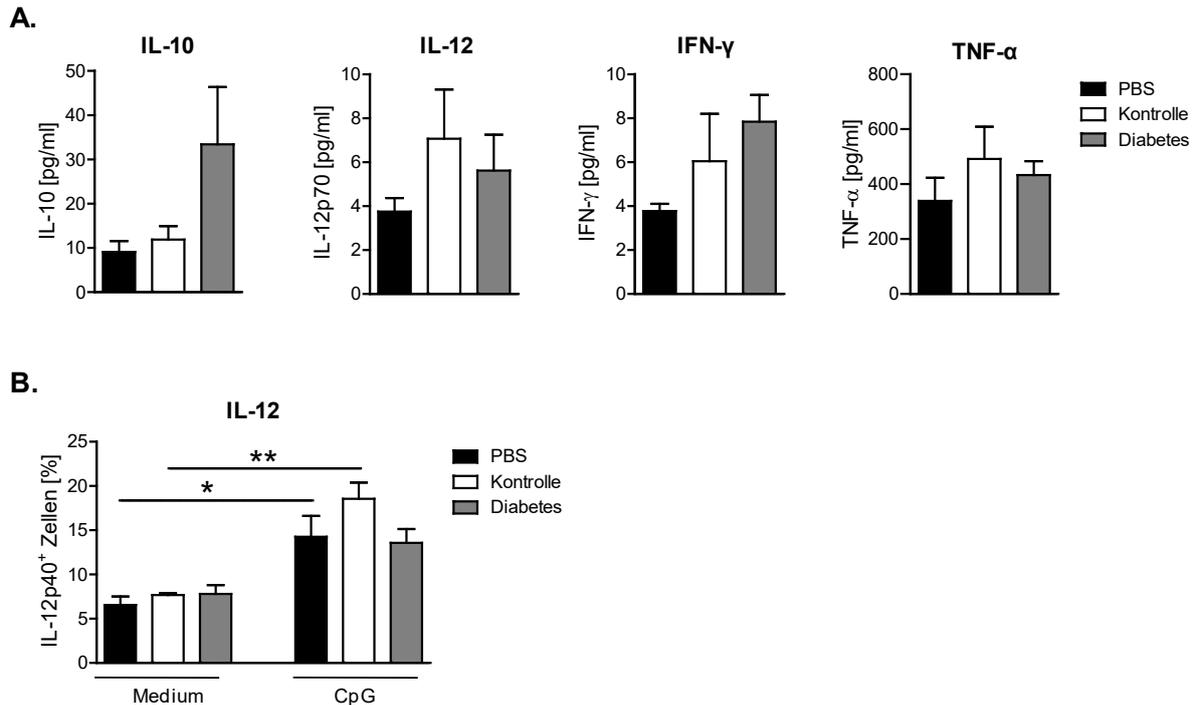


Abbildung 26: Zytokinprofil der DC aus der Milz der Empfängertiere nach CD8⁺ T-Zell-Transfer. Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen von diabetischen NMRI-Mäusen oder Kontrolltieren in NMRI-*Foxn1^{nu}* Mäuse, wurden die DC aus der Milz der Empfängertiere mittels MACS Separation isoliert und über Nacht mit CpG stimuliert. Als Kontrolle für den Transfer dienten NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse, die nur PBS anstelle der entsprechenden CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. Am darauffolgenden Tag wurde die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA oder CBA bestimmt (A). Außerdem wurden die Zellen geerntet, intrazellulär gegen IL-12p40 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (B). Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen mit dem Standardfehler des Mittelwertes von vier verschiedenen Versuchen mit je n = 3-5 Mäusen. Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung der "one-way ANOVA" mit anschließendem Bonferroni Test berechnet. * p < 0,05, ** p < 0,01

Abbildung 26A zeigt, dass die Werte der proinflammatorischen Zytokine bei den Tieren, die die T-Zellen erhalten hatten, tendenziell über den Werten der Tiere lagen, die PBS erhalten hatten. Die Werte für das antiinflammatorische IL-10 lagen bei den Tieren, die die T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten, auf einem ähnlichen Niveau wie die Werte der Tiere, die PBS erhalten hatten. Auffällig war, dass hier die Werte der Tiere, die die diabetischen T-Zellen erhalten hatten, höher waren als die der nicht diabetischen Kontrolltiere und der Kontrollgruppe mit PBS. Bei den proinflammatorischen Zytokinen zeigte sich eine Tendenz zu weniger IL-12 und mehr IFN-γ bei den Tieren, die die diabetischen T-Zellen erhalten hatten, im Vergleich zu den Tieren, die die Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten. Bei TNF-α zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu einer geringeren Konzentration an TNF-α bei den Tieren, die die diabetischen T-Zellen erhalten hatten.

Bei der Analyse der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich, dass die DC aller drei Gruppen durch die Stimulation mit CpG angeregt wurden IL-12 zu produzieren (Abbildung 26B). Dabei lag der prozentuale Anteil der Zellen, die IL-12 exprimierten bei den Tieren, die die T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten, deutlich über

dem der Tiere, die PBS oder die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten. Wobei der prozentuale Anteil bei den Tieren, die PBS erhalten hatten, auf einem ähnlichen Niveau lag wie der prozentuale Anteil bei den Tieren, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten.

In Gegenwart von T-Zellen aus diabetischen Tieren differenzierten DC zu einem Phänotyp mit einer tendenziell verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine und einer vermehrten Expression des antiinflammatorischen IL-10 verglichen mit den DC der Tiere, die die T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten.

4.6.4.6 Analyse des Aktivierungszustandes neu generierter BMDC der NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse nach CD8⁺ T-Zell Transfer

Um weiter den Einfluss der transferierten CD8⁺ T-Zellen auf neu generierte DC zu untersuchen, wurden die Knochenmarkszellen der Tiere, die PBS erhalten hatten, sowie die Knochenmarkszellen der Tiere, die entweder CD8⁺ T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere oder der diabetischen Tiere erhalten hatten, isoliert und in Anwesenheit von GM-CSF für acht bis neun Tage kultiviert, um die Differenzierung zu BMDC zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 hin untersucht. Außerdem wurden die Zellen über Nacht mit CpG oder LPS stimuliert und anschließend wiederum auf die Expression von CD40 und CD86, als Marker für ihre Aktivierbarkeit, hin untersucht.

Wie Abbildung 27 zeigt, gab es zwischen den BMDC der Tiere, die PBS erhalten hatten und den Tieren, die CD8⁺ T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere oder diabetischen Tiere erhalten hatten, keine nennenswerten Unterschiede bezüglich der Expression der kostimulatorischen Moleküle. Die Stimulation der Zellen mit CpG oder LPS führte zwar zu einem deutlichen Anstieg der CD40 Expression, jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Die CD86 Expression war nach der Stimulation mit CpG bei den BMDC der Tiere, die CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten, etwas höher als bei den Tieren, die PBS erhalten hatten, jedoch schwankten die Werte bei den einzelnen Versuchen stark. Bei der Stimulation mit LPS zeigten die BMDC der Tiere, die keine T-Zellen sondern PBS erhalten hatten, eine höhere Expression an CD86 als die BMDC der Tiere, die CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. In beiden Fällen unterschied sich die Expression der BMDC der Tiere, die die Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten, nicht von den BMDC der Tiere, die die Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten.

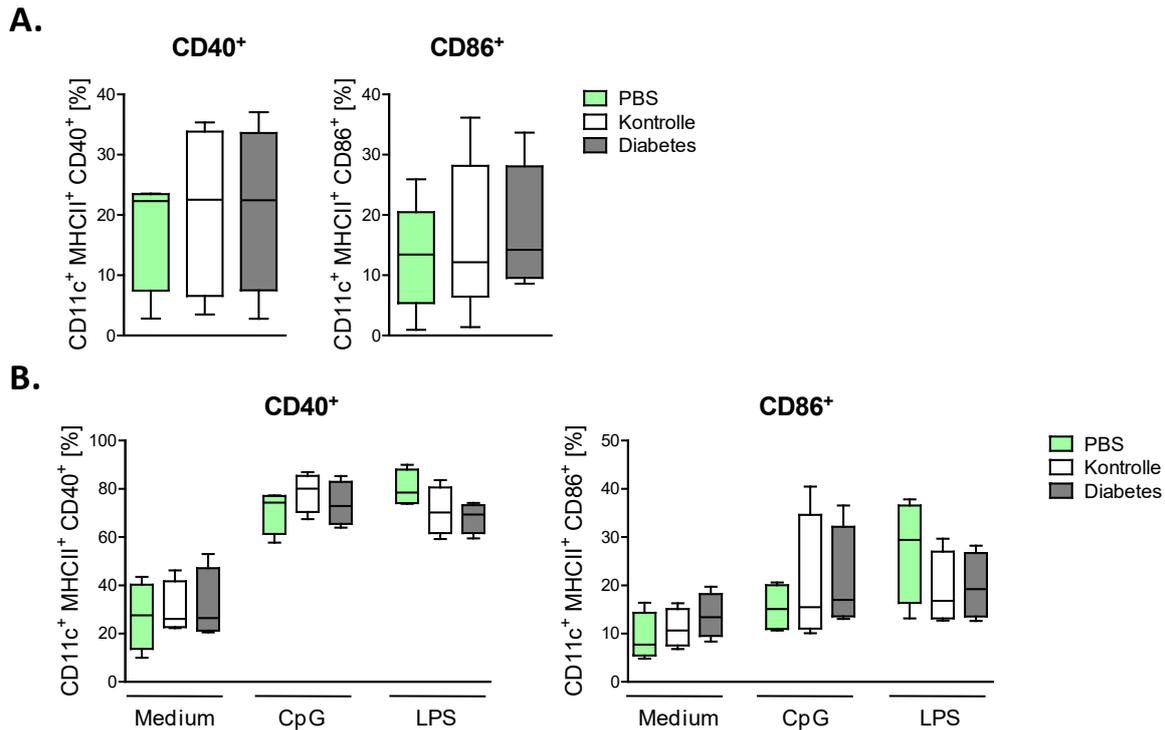


Abbildung 27: Analyse der CD40 und CD86 Expression der BMDC der Empfängertiere nach CD8⁺ T-Zell-Transfer. Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen aus diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren, wurden die Knochenmarkzellen der Empfängertiere isoliert, gruppenweise gepoolt und mit GM-CSF in Kultur genommen, um die Differenzierung zu BMDC zu gewährleisten. Als Kontrolle für den Transfer dienten NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse, die nur PBS anstelle der entsprechenden CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. An Tag 8-9 wurden die Zellen geerntet, mit Antikörpern gegen CD40, CD86 und CD11c gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil CD40⁺ und CD86⁺ positiver Zellen an der Zahl der CD11c⁺ Zellen (A). Außerdem wurden die BMDC über Nacht mit CpG oder LPS stimuliert und anschließend wiederum auf die Expression von CD40 und CD86 hin untersucht (B). Dargestellt sind Tukey Box-Plots der jeweiligen Gruppen aus vier Versuchen mit n = 3-5 Tieren pro Gruppe.

4.6.4.7 Zytokinprofil der BMDC der NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse nach CD8⁺ T-Zell-Transfer

Um einen möglichen Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Zytokinproduktion der neu generierten DC zu untersuchen, wurde der Überstand der über Nacht mit CpG oder LPS stimulierten BMDC mittels CBA oder ELISA auf die Konzentration verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine hin untersucht.

Wie Abbildung 28 zeigt, produzierten die BMDC der Tiere, die T-Zellen erhalten hatten, nach der Stimulation mit CpG tendenziell geringere Mengen der untersuchten Zytokine, als die BMDC der Tiere, die nur PBS erhalten hatten. Eine Ausnahme bildete IL-10. Hier lagen die Werte der Tiere, die die diabetischen T-Zellen erhalten hatten, im Mittel auf einem ähnlichen Niveau wie die Werte der Tiere, die PBS erhalten hatten. Lediglich die Werte der Tiere, die die Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten, sind etwas geringer. Bei den proinflammatorischen Zytokinen zeigten die Tiere, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, eine Tendenz zu mehr IL-12 und IL-6 und weniger IL-23 als bei den Tieren, die die T-Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Stimulation mit LPS. Hier gab

es bei den Werten für IL-10 jedoch eine leichte Tendenz zu mehr IL-10 nach dem Transfer der T-Zellen. Diese Tendenz war bei den Tieren, die die Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, noch etwas ausgeprägter als bei den Tieren, die die Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere erhalten hatten.

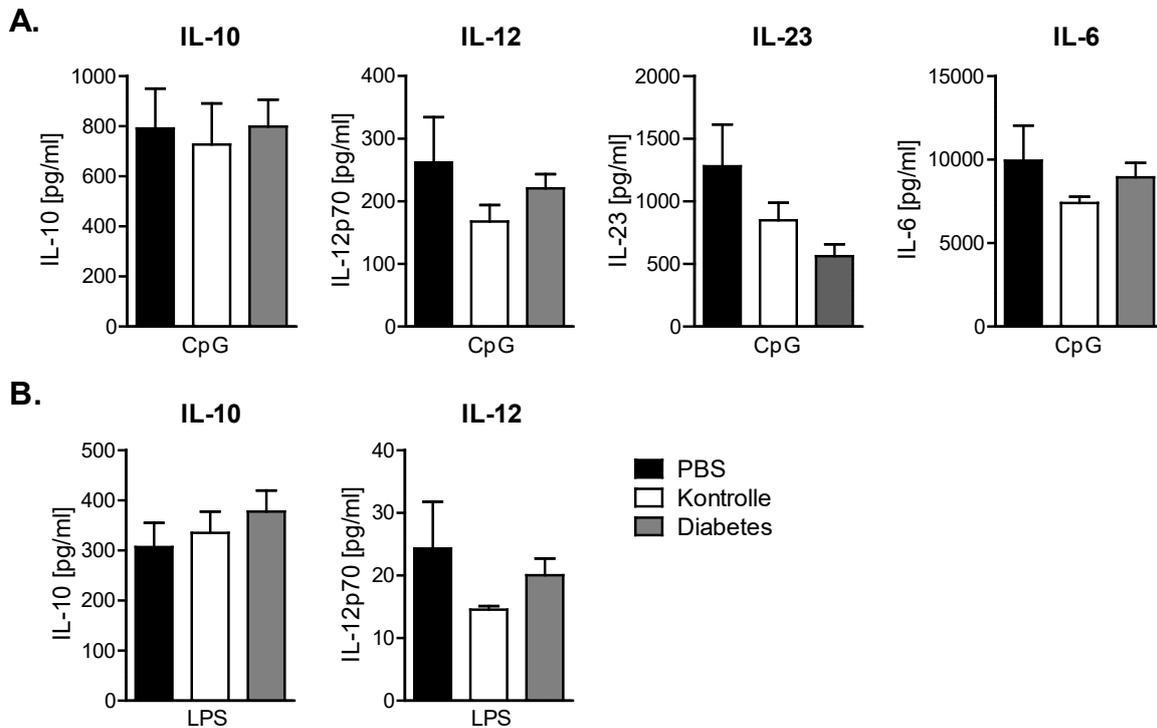


Abbildung 28: Zytokinprofil der BMDC der Empfängertiere nach CD8⁺ T-Zell-Transfer. Zwei Wochen nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen von diabetischen NMRI-Mäusen oder Kontrolltieren in NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse wurden die Knochenmarkszellen der Empfängertiere isoliert und mit GM-CSF kultiviert. Als Kontrolle für den Transfer dienten NMRI-*Foxn1^{nu}*-Mäuse, die nur PBS anstelle der entsprechenden CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten. Nach acht bis neun Tagen wurden die Zellen geerntet und über Nacht mit CpG oder LPS stimuliert. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA (IL-10, IL-12) oder CBA (IL-6, IL23) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes aus vier Versuchen mit n = 3-5 Mäusen.

Während die transferierten CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere keinen Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle neu generierter BMDC hatten, zeigte das Zytokinprofil der neu generierten BMDC der Tiere, die die diabetischen T-Zellen erhalten hatten, eine Tendenz zu einer erhöhten Produktion des antiinflammatorischen IL-10 nach Stimulation. Auch die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-6 waren bei den BMDC der Tiere, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, tendenziell erhöht. Lediglich die Expression von IL-23 war bei den BMDC der Tiere, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, vermindert.

5. Diskussion

Sepsis ist eine systemische Infektion, bei der es zu lebensbedrohlichen Organdysfunktionen kommt. Neben einer zu Beginn der Sepsis meist dominierenden proinflammatorischen Immunreaktion, entwickelt sich dabei eine Immunsuppression, die auch bestehen bleibt, nachdem die eigentliche Infektion abgeklungen ist. Dies führt dazu, dass Patienten, die einmal eine Sepsis erlitten haben, anfälliger für Infektionen bleiben [37].

Unter Verwendung der CLP, einem murinen Modell der polymikrobiellen Sepsis, konnte gezeigt werden, dass die dendritischen Zellen der septischen Tiere einen veränderten Phänotypen aufweisen und nach Stimulation mit LPS oder CpG geringere Mengen des proinflammatorischen IL-12 und größere Mengen des antiinflammatorischen IL-10 produzieren. Diese Dysfunktion der DC ist auf eine veränderte Differenzierung der DC im Knochenmark zurückzuführen [76].

Verschiedene Faktoren können die Entstehung bzw. den Verlauf einer Sepsis beeinflussen. Neben dem Alter und der Ethnie spielen auch chronische Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, eine Rolle. Patienten, die unter Typ 1 Diabetes mellitus leiden, sind anfälliger für Infektionen und für Komplikationen während einer Sepsis [75].

Hier sollte untersucht werden, ob diese erhöhte Anfälligkeit während des T1DM durch eine verstärkte Immunsuppression erklärt werden kann und in welcher Weise die DC während des T1DM zu dieser erhöhten Anfälligkeit beitragen. Dabei stand vor allem der mögliche Einfluss der autoreaktiven zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen auf die Funktion der DC bzw. auf die Differenzierung der DC im Knochenmark im Fokus.

5.1 Das Low-Dose Streptozotocin Modell des T1DM

Zur Untersuchung des T1DM können verschiedene murine Modelle verwendet werden. Neben den Akita-Mäusen, die eine Mutation des Insulingens und einen Verlust der β -Zellfunktion aufweisen [12, 54], werden häufig auch non-obese diabetic (NOD)-Mäuse eingesetzt, die spontan autoimmun T1DM entwickeln können [20]. Ein weiteres Modell des T1DM ist darüber hinaus das Low-Dose Streptozotocin Modell, das im Rahmen dieser Dissertation in der Arbeitsgruppe etabliert wurde. Durch die wiederholte Gabe niedrig dosierten STZ werden die β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas angegriffen und zerstört. Dabei sorgt die niedrige Dosierung dafür, dass die β -Zellen zunächst nicht vollständig zerstört werden, sondern Peptidfragmente freigesetzt werden, die als Antigene für die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen wirken [64] und so die Autoimmunreaktion gegen die β -Zellen triggern. Da hier der Einfluss der autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen untersucht werden sollte, bot sich das Low-Dose Streptozotocin Modell zur Induktion des T1DM an. Darüber hinaus hat dieses Modell den Vorteil, dass T1DM zeitgleich in einer definierten Anzahl von Tieren ausgelöst werden kann und die Werte der einzelnen Tiere somit besser vergleichbar

sind. Außerdem lässt sich das Low-Dose Streptozotocin Modell auf verschiedene Mausstämme anwenden.

Hier wurde das Low-Dose Streptozotocin Modell zunächst bei C57BL/6-Mäusen angewandt. Die erhöhte Glukosekonzentration im Blut der STZ-behandelten Tiere, eine Woche nach der letzten STZ Gabe (Abbildung 5A), steht im Einklang mit den von Kim *et al.* beschriebenen Daten [47] und weist darauf hin, dass die Behandlung mit STZ zur Induktion des T1DM führte. Der weitere Anstieg der Glukosekonzentration im Verlauf der Zeit kann durch die fortschreitende Zerstörung der β -Zellen erklärt werden. Ab einem bestimmten Zeitpunkt stagnierte der Wert, da dann alle β -Zellen zerstört waren und sich durch das stetige Ausscheiden der Glukose über den Urin ein Gleichgewicht einstellte.

Neben den C57BL/6-Mäusen konnte das Low-Dose Streptozotocin Modell zudem in NMRI-Mäusen etabliert werden (Abbildung 5A).

5.2 T1DM verstärkt die Immunsuppression während einer Sepsis

Die CLP ist ein gängiges Modell der polymikrobiellen Sepsis und in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert [32, 76]. Hier wurde eine subletale Form angewandt. Während der akuten Phase der Sepsis wandern verschiedene Zellen der angeborenen Immunantwort in das Peritoneum, um die durch die Punktion des Zökums sezernierten Bakterien zu beseitigen. Granulozyten spielen dabei eine entscheidende Rolle, da sie zu den ersten Zellen gehören, die an der Beseitigung der Bakterien beteiligt sind [98]. Diabetische Tiere zeigten nach der CLP eine verminderte Einwanderung Ly6G⁺ Granulozyten im Vergleich zu nicht diabetischen Kontrolltieren (Abbildung 6A). Die verminderte Zahl an Granulozyten war dabei verbunden mit einer höheren bakteriellen Belastung (Abbildung 6B). Dies bestätigt die Beobachtung, dass diabetische Tiere anfälliger für Infektionen sind [63, 75]. Der genaue Mechanismus, der zu der verminderten Einwanderung der Granulozyten führte, wurde hier nicht näher untersucht. Denkbar wäre eine verringerte Rekrutierung der Granulozyten zum Ort der Infektion durch eine veränderte Chemotaxis [23, 38, 100]. Es wäre aber auch möglich, dass bereits die Entstehung der Granulozyten im Knochenmark bei den diabetischen Tieren verändert ist. Bei NOD-Mäusen zeigen die Progenitorzellen der Granulozyten eine verminderte Fähigkeit auf Zytokine zu reagieren [52, 86] und es werden weniger reife Zellen generiert [42].

Neben den Granulozyten spielen bei der Beseitigung der Bakterien auch die DC eine wichtige Rolle, da sie als APC eine wichtige Verbindung zur adaptiven Immunantwort darstellen, indem sie das Priming der T_H1-Antwort auslösen und NK-Zellen zur Produktion von IFN- γ stimulieren [5, 29]. Wie in unserer Arbeitsgruppe bereits festgestellt werden konnte, zeigen die DC der CLP-operierten Tiere einen dysfunktionalen Phänotyp. Nach Stimulation mit CpG oder LPS sezernieren sie höhere Mengen des antiinflammatorischen IL-

10 und geringere Mengen des proinflammatorischen IL-12. Diese Dysfunktion wird bereits durch eine veränderte Differenzierung der DC im Knochenmark ausgelöst [76]. In den hier durchgeführten Experimenten zeigten die neu generierten BMDC der diabetischen, Sham-operierten Tiere bereits eine signifikant höhere IL-10 Expression im Vergleich zu den nicht diabetischen, Sham-operierten Tieren der Kontrollgruppe. Die *de novo* generierten DC der diabetischen Tiere zeigen also bereits für sich eine veränderte Zytokinproduktion zu Gunsten des antiinflammatorischen IL-10. Dieser Effekt wird durch die CLP noch verstärkt (Abbildung 7B). Die vermehrte IL-10 Produktion der DC könnte somit möglicherweise zu der erhöhten Anfälligkeit der diabetischen Tiere gegenüber einer Sepsis beitragen.

5.3 DC diabetischer Tiere zeigen *ex vivo* einen dysfunktionalen Phänotyp

Die direkte Analyse der BMDC der diabetischen Tiere ohne vorangegangene CLP oder Sham-Operation bestätigt, dass diese nach Stimulation mit CpG oder LPS bereits für sich höhere Mengen des antiinflammatorischen IL-10 (Abbildung 8) und tendenziell geringere Mengen des proinflammatorischen IL-12 (Daten nicht gezeigt) produzierten. Dies lässt darauf schließen, dass bereits der Streptozotocin-induzierte T1DM die Differenzierung der DC beeinflusste und zu einer vermehrten Expression antiinflammatorischer Zytokine durch die DC führte. Darüber hinaus wiesen die *de novo* generierten DC der diabetischen NMRI-Mäuse nach der Übernachtskultur bereits ohne Stimulation eine tendenziell höhere Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 auf. Nach der Stimulation mit CpG oder LPS nahm die Expression der Moleküle bei den BMDC in gleichem Maße zu wie bei den BMDC der nicht diabetischen Tiere. Dies zeigt, dass der T1DM zwar das Zytokinprofil neu generierter DC in Richtung einer antiinflammatorischen Antwort beeinflusste, sich dies jedoch nicht auf die Reifung der DC auswirkte (Abbildung 18). Diese Daten decken sich zum Teil mit den Beobachtungen von Lee *et al.*, die BMDC von diabetischen NOD-Mäusen und C57BL/6-Mäusen untersuchten und feststellten, dass die BMDC der NOD-Mäuse nach Stimulation mit LPS geringere Mengen an IL-12 produzieren. Im Gegensatz zu der hier beobachteten unveränderten Expression der kostimulatorischen Moleküle, stellten sie jedoch eine verminderte Expression an CD80, CD86 und CD40 fest [53]. Auch bei Untersuchungen der DC von Patienten mit T1DM bzw. deren Angehörigen mit dem Risiko ebenfalls an T1DM zu erkranken, weisen die DC ähnliche Veränderungen in Phänotyp und Funktion auf, wie die von Lee *et al.* im NOD-Modell beschrieben und zeigten ebenfalls eine geringere Expression kostimulatorischer Moleküle [42, 92]. Ein Grund dafür, dass in der vorliegenden Studie keine verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle beobachtet wurde, könnte in der Dauer des Diabetes liegen, da hier nur Zellen acht Wochen nach der Induktion des Diabetes untersucht wurden. Ob die Expression der

kostimulatorischen Moleküle zu einem späteren Zeitpunkt, nach Fortschreiten der Erkrankung, möglicherweise ebenfalls auftreten würde, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Für eine Zunahme der Dysfunktion der DC mit Fortschreiten der Erkrankung spricht die Analyse der, aus der Milz der diabetischen Tiere isolierten, DC. Diese wiesen eine veränderte Zytokinproduktion auf und exprimierten, nach Stimulation mit CpG, bereits vier Wochen nach der Induktion des Diabetes geringere Mengen IL-12 und tendenziell höhere Mengen IL-10. Diese Verschiebung hin zu einer antiinflammatorischen Antwort war umso ausgeprägter je weiter die Erkrankung vorangeschritten war (Abbildung 9). Eine Zunahme der Unterschiede in der Zytokinproduktion, bedingt durch eine veränderte Zusammensetzung der DC-Subpopulationen, wurde in diesem Ansatz nicht untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Analyse der DC der diabetischen NMRI-Mäuse, war ein leichter Anstieg an CD11c⁺ DC in der Milz der diabetischen Tiere zu erkennen, jedoch gab es keine Unterschiede bezüglich des Anteils der CD4⁺ CD8⁻, CD4⁻ CD8⁺ und CD4⁻ CD8⁻ Subpopulationen (Abbildung 16). Dies spricht dafür, dass die Unterschiede in der Zytokinproduktion eher durch eine Zunahme der DC-Dysfunktion mit Fortschreiten der Erkrankung als durch eine Veränderung in der Zusammensetzung der DC-Subpopulationen zu erklären sind. Da bei den NMRI-Mäusen jedoch auf die Untersuchung der Zytokinproduktion der DC aus der Milz der NMRI-Spendertiere zu Gunsten der Zellgewinnung der CD8⁺ T-Zellen für den T-Zell-Transfer verzichtet wurde und zudem nur der Zeitpunkt von acht Wochen nach Induktion des Diabetes untersucht wurde, müssten diese Analysen für eine eindeutige Aussage ergänzt werden.

Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 auf den DC aus der Milz der diabetischen NMRI-Mäuse unterschied sich, wie schon bei den BMDC, nicht von der Expression dieser Moleküle auf den DC aus der Milz der nicht diabetischen Kontrolltiere (Abbildung 17) und zeigt, dass es keinen Unterschied bezüglich der Reifung der DC gab. Dies könnte jedoch, wie bereits erwähnt, abhängig von der Dauer der Erkrankung sein.

Die DC der diabetischen Tiere zeigen also, ähnlich wie die DC septischer Tiere, einen dysfunktionalen Phänotyp mit erhöhter Expression des antiinflammatorischen IL-10 und verminderter Expression des proinflammatorischen IL-12.

Die Immunsuppression, die während einer Sepsis auftritt, wird als Gegenreaktion des Körpers auf die anfängliche Hyperinflammation während der systemischen Entzündung verstanden [37]. Dabei scheint es jedoch zu einer Fehlregulation dieser Gegenreaktion zu kommen, da die Patienten, die eine Sepsis erlitten haben, auch nach der eigentlichen Genesung anfälliger für Infektionen bleiben [24]. Die Differenzierung der beschriebenen

dysfunktionalen DC bei einer Sepsis könnte also als Gegenreaktion des Körpers gesehen werden, um die Entzündungsreaktion zu begrenzen.

Zu einer Entzündungsreaktion kommt es auch während des T1DM. Betroffen sind hierbei die Langerhans-Inseln des Pankreas. An dieser Entzündungsreaktion sind anfänglich auch DC beteiligt, da sie Peptidfragmente der β -Zellen aufnehmen und sie den zytotoxischen T-Zellen präsentieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass DC, die mit Fragmenten apoptotischer β -Zellen kultiviert wurden, scheinbar einen tolerogenen Phänotyp entwickeln und zur Hemmung der zytotoxischen T-Zellen beitragen [62].

Somit könnte die Entwicklung dysfunktionaler DC als Gegenreaktion des Körpers auf die Insulitis gewertet werden, mit der er versucht diese Entzündung zu begrenzen. So lässt sich auch die Zunahme der Ausprägung des dysfunktionalen Phänotyps mit Fortschreiten der Erkrankung erklären, da der Körper, mit zunehmender Stärke der Entzündung, weiter versucht gegenzusteuern.

Welche Mechanismen an der Entstehung der DC-Dysfunktion beteiligt sind, ist dabei jedoch noch nicht geklärt. Möglicherweise spielen $CD8^+$ T-Zellen bei der Entstehung der Dysfunktion eine Rolle. Dabei könnten die T-Zellen einen direkten Effekt auf die Funktion der bereits ausdifferenzierten DC haben. Denkbar wäre aber auch ein Einfluss auf die Differenzierung der DC im Knochenmark.

5.4 Charakterisierung der T-Zellen diabetischer NMRI-Mäuse

5.4.1 Anstieg $CD8^+$ T-Zellen im Knochenmark diabetischer Tiere

Da der Einfluss der T-Zellen auf Funktion der DC sowie deren Differenzierung im Knochenmark untersucht werden sollte, lag es nahe, die T-Zellen der diabetischen Tiere zunächst zu charakterisieren.

Dabei wurden zum einen die T-Zellen in der Milz untersucht, da die später transferierten Zellen aus der Milz isoliert wurden, zum anderen wurden die T-Zellen im Knochenmark untersucht, um eventuelle Unterschiede zwischen den diabetischen Tieren und den nicht diabetischen Kontrolltieren aufzudecken.

Im Knochenmark diabetischer NOD-Mäuse konnten bereits autoreaktive T-Zellen nachgewiesen werden [56]. Der Anstieg sowohl der $CD4^+$ als auch der $CD8^+$ T-Zellen im Knochenmark der diabetischen Tiere könnte dafür sprechen, dass auch hier autoreaktive Zellen in das Knochenmark der diabetischen Tiere einwanderten. Der Anstieg könnte aber auch durch eine vermehrte Proliferation autoreaktiver T-Zellen erklärt werden (Abbildung 12C). Die Analyse der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 zeigte außerdem, dass der Anteil $CD25^+$ T-Zellen im Knochenmark der diabetischen Tiere erhöht war, was ebenfalls für eine Zunahme aktivierter und somit möglicherweise autoreaktiver T-Zellen spricht

(Abbildung 13C). Die Annahme, dass autoreaktive T-Zellen in das Knochenmark einwandern, wird weiter gestützt durch den Anstieg an T_E-Zellen im Knochenmark der diabetischen Tiere (Abbildung 14C). Chee *et al.* konnten im NOD-Modell bereits zeigen, dass autoantigenspezifische T-Zellen nach ihrem Kontakt zu dem Antigen in den Langerhans-Inseln des Pankreas proliferieren und ihre Anzahl in den peripheren lymphatischen Geweben mit der Schwere der Insulinitis korreliert. Zudem zeigen diese Zellen eine hohe Expression an CD44 und geringe Expression an CD62L [19]. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem hier vorliegenden Anstieg an CD44^{hi} CD62L⁻ T_E-Zellen ebenfalls um T-Zellen handelt, die durch die Autoantigene der β -Zellen aktiviert wurden.

5.4.2 CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere zeigen erhöhte IFN- γ Expression *ex vivo*

CD8⁺ T-Zellen produzieren verschiedene Zytokine und können damit einen großen Einfluss auf andere Zellen des Immunsystems haben. Eine zentrale Rolle spielt IFN- γ . Dabei kann IFN- γ einen direkten Einfluss auf die Funktion der DC haben. Aber auch die Differenzierung der DC im Knochenmark wird stark von den Zytokinen in dem sie umgebenden Mikromilieu bestimmt.

Hier zeigten die CD8⁺ T-Zellen und insbesondere die CD8⁺ CD44^{hi} Memory T-Zellen aus der Milz der diabetischen Tiere eine erhöhte IFN- γ Expression verglichen mit den Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine konstitutive Produktion, da die Zellen bereits *ex vivo* ohne weitere Stimulation höhere Mengen IFN- γ sezernierten (Abbildung 15D).

Es ist bekannt, dass CD8⁺ Memory T-Zellen im Knochenmark, nach einer bereits erfolgten Immunisierung, bei einer erneuten Infektion antigenunabhängig IFN- γ produzieren [89]. Kambayashi *et al.* konnten zudem zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen mit einem CD44^{hi} Memory Phänotyp in der Milz und in den Lymphknoten nach der Injektion von LPS antigenunabhängig IFN- γ produzieren. Darüber hinaus konnten sie auch zeigen, dass dies nicht nur nach einer bakteriellen Stimulation auftritt, sondern auch, wenn Mäusen Typ 1 Interferone (IFN- α/β) oder poly I:C, synthetisch hergestellte doppelsträngige RNA, die die Aktivierung durch RNA-Viren nachahmt, injiziert wird. CD8⁺ T-Zellen produzieren somit nicht nur bei bakteriellen, sondern auch bei viralen Infektionen antigenunabhängig IFN- γ [44].

Bei T1DM handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, somit befinden sich die Zellen des Immunsystems in einer permanenten Abwehrreaktion gegen körpereigene Zellen. Es liegt daher nahe, dass die CD8⁺ CD44^{hi} Memory T-Zellen, ähnlich wie bei einer bakteriellen oder viralen Infektion, IFN- γ produzieren.

Ebenfalls waren es die CD8⁺ CD44^{hi} T-Zellen der diabetischen Tiere, die nach der antigenabhängigen Stimulation mit einem kommerziellen Peptidgemisch des Autoantigens GAD65 mit einem signifikanten Anstieg der IFN- γ Produktion reagierten, während es bei den

Zellen der nicht diabetischen Tiere nur zu einem leichten Anstieg kam (Abbildung 15B). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den CD8⁺ CD44^{hi} T-Zellen um autoreaktive T-Zellen handelte, die verstärkt auf das Autoantigen reagierten. Gestützt wird diese Hypothese ebenfalls durch die Daten der antigenunabhängigen Stimulation mit PMA und Ionomycin. Hier zeigten sowohl die gesamt CD8⁺ T-Zellen als auch die CD8⁺ CD44^{hi} T-Zellen beider Gruppen (diabetische Tiere und Kontrolltiere) einen signifikanten Anstieg der IFN- γ Produktion nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin. Dabei sind die Werte der Zellen der diabetischen Tiere generell, d.h. mit und ohne Stimulation, etwas höher als die Werte der Zellen der nicht diabetischen Kontrolltiere. Es waren jedoch keine Unterschiede bei der Aktivierbarkeit der Zellen diabetischer und nicht diabetischer Kontrolltiere, bezogen auf den Anstieg der IFN- γ nach der Stimulation, erkennbar (Abbildung 15C).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass es bei den diabetischen Tieren zu einem Anstieg aktivierter CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark kam. Dabei nahm sowohl die Zahl an T_E- als auch T_{CM}-Zellen zu. Zusammen mit den Daten der erhöhten IFN- γ Produktion der CD8⁺ CD44^{hi} Memory T-Zellen in der Milz der diabetischen Tiere stützen diese Ergebnisse die Hypothese des Einflusses der CD8⁺ T-Zellen auf die DC. IFN- γ kann dabei sowohl einen direkten Einfluss auf die Funktion der bereits ausdifferenzierten DC in der Milz haben als auch die Differenzierung der DC im Knochenmark beeinflussen. Das Knochenmark ist eine der bevorzugten Nischen für Memory T-Zellen, auch wenn das initiale Priming der Zellen schon lange zurück liegt und keine Antigene mehr vorliegen [25]. Es ist bekannt, dass T-Zellen während einer akuten oder chronischen Entzündung die Hämatopoese beeinflussen können [93]. T_{CM} sind dabei potente Produzenten von IFN- γ . Dabei kann IFN- γ die Hämatopoese entscheidend beeinflussen und indirekt wirken, indem es beispielsweise die IL-6 Produktion der Stroma-Zellen im Knochenmark stimuliert und so wiederum die Myelopoese verstärkt [84]. Es kann aber auch direkt auf die HSC wirken [11, 21, 22].

In weiteren Schritten wurde daher der Einfluss der CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere sowohl auf die Funktion naiver DC *in vitro* als auch auf die Differenzierung der DC *in vivo* untersucht.

5.5 CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere beeinflussen die Funktion bereits differenzierter DC *in vitro*

Zytotoxische T-Zellen können verschiedene Zytokine wie z. B. IFN- γ oder TNF- α sezernieren und so andere Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und NK-Zellen beeinflussen [7]. Die CD8⁺ CD44^{hi} T-Zellen der diabetischen Tiere exprimierten konstitutiv IFN- γ . Daher wäre es möglich, dass die, durch Autoantigene aktivierten, CD8⁺ T-Zellen auch die Funktion der DC der diabetischen Tiere beeinflussen könnten und so zu der veränderten Zytokinproduktion beitragen.

Die Kokultur aus CD8⁺ T-Zellen mit naiven BMDC zeigte, dass die T-Zellen einen direkten Einfluss auf die Funktion der DC *in vitro* hatten. CD8⁺ T-Zellen nicht diabetischer Tiere regten dabei die DC dazu an, proinflammatorische Zytokine wie IL-12 zu sezernieren, während die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 eher unterdrückt wurde.

DC, die mit CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere kultiviert wurden, wiesen hingegen die gleichen Veränderungen in der Zytokinproduktion auf wie die zuvor untersuchten DC der diabetischen Tiere *in vivo*. Sie exprimierten geringere Mengen IL-12 und größere Mengen IL-10 als die BMDC, die mit den CD8⁺ T-Zellen der nicht diabetischen Tiere kultiviert wurden (Abbildung 10). Somit konnte nachgewiesen werden, dass CD8⁺ T-Zellen einen direkten Effekt auf die Zytokinproduktion naiver BMDC haben und dass CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere die DC in Richtung einer vermehrten IL-10 und verminderten IL-12 Produktion beeinflussen.

Dass CD8⁺ T-Zellen einen Einfluss auf die Funktion und Reifung der DC haben können, zeigen auch die Beobachtungen von Maillard *et al.*, die den Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Reifung und Zytokinproduktion der DC im humanen Ansatz untersuchten. Sie konnten zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen unter anderem auf die IL-12 Produktion der DC wirken [60]. Über welche Mechanismen die CD8⁺ T-Zellen die Funktion der DC beeinflussen und ob dies allein über Mediatoren wie beispielsweise IFN- γ geschieht oder ob ein direkter Zell-Zell Kontakt stattfindet, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen und könnte durch die Verwendung von Transwell-Platten weiter analysiert werden. Für einen Einfluss löslicher Mediatoren sprechen ebenfalls die Untersuchungen von Maillard *et al.*, die zeigen, dass, neben IFN- γ , vor allem TNF- α eine entscheidende Rolle bei der Reifung und Funktion der DC spielt [60]. In zukünftigen Versuchen sollte daher die Zytokinproduktion der T-Zellen weiter untersucht werden.

Neben der Analyse des Einflusses der CD8⁺ T-Zellen auf die Funktion der DC *in vitro* wurde in einem weiteren Schritt der Einfluss der CD8⁺ T-Zellen sowohl auf die Funktion als auch auf die Differenzierung der DC *in vivo* untersucht. Hierzu wurde ein Transfermodell mit athymischen und somit T-Zell-defizienten NMRI-Foxn1^{nu}-Mäusen verwendet.

5.6 Einfluss CD8⁺ T-Zellen auf die Funktion und Differenzierung dendritischer Zellen *in vivo*

Mausstämme mit der Bezeichnung *nude*, wie die hier verwendeten NMRI-Foxn1^{nu}-Mäuse, werden in der Forschung häufig benutzt, um den Einfluss von T-Zellen auf verschiedene Immunreaktionen *in vivo* zu untersuchen. Im NOD-Modell des T1DM wurden bereits NOD-*nude*-Mäuse benutzt, um die Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen an der Entzündungsreaktion in den Langerhans-Inseln im Pankreas zu untersuchen [109].

In dieser Arbeit wurde das Low-Dose Streptozotocin Protokoll angewandt, um T1DM in NMRI-Mäusen zu induzieren und anschließend ein Transfer der CD8⁺ T-Zellen in NMRI-

Foxn1^{nu}-Mäuse durchgeführt, um den Einfluss der CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere auf die Funktion und Differenzierung der DC *in vivo* zu untersuchen.

Nach dem Transfer CFSE markierter CD8⁺ T-Zellen von naiven Tieren waren die i.v. injizierten Zellen bereits nach zwei Tagen sowohl in der Milz als auch im Knochenmark der Empfängertiere nachzuweisen (Abbildung 19). Dabei proliferierten die CD8⁺ T-Zellen vor allem zu T-Zellen mit dem CD44^{hi} Memory-Phänotyp (Abbildung 20). Diese Beobachtung könnte durch die so genannte homöostatische Proliferation erklärt werden, bei der T-Zellen nach dem Transfer in T-Zell-defiziente Tiere hauptsächlich zu T-Zellen mit dem beschriebenen Memory-Phänotyp proliferieren [35, 91].

Die transferierten CD8⁺ T-Zellen, sowohl der diabetischen Tiere als auch der nicht diabetischen Kontrolltiere, differenzieren ebenfalls hauptsächlich zu CD44^{hi} T_E-Zellen. Dabei zeigt sich eine Tendenz zu mehr T_E-Zellen bei den Tieren, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten (Abbildung 23). Es ist bekannt, dass durch den Transfer von CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere T1DM in vorher gesunden Empfängertieren ausgelöst werden kann [108]. Die erhöhte Anzahl an T_E-Zellen bei den Tieren, die die CD8⁺ der diabetischen Tiere erhalten hatten, könnte somit ein Hinweis auf eine vorliegende Immunreaktion im Rahmen des T1DM sein. Da die Anzahl der T_E-Zellen jedoch auch bei den diabetischen Spendertieren schon erhöht war und bei dem Transfer nur auf die Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen geachtet wurde, könnte dieser Unterschied auch darauf zurückzuführen sein, dass bereits durch den Transfer eine höhere Anzahl an T_E-Zellen übertragen wurde.

Eine einfache Möglichkeit, um dieser Frage weiter nachzugehen, wäre, die transferierten Zellen mit CFSE zu markieren, um die Proliferation der verschiedenen Populationen weiter zu untersuchen.

Eine verlässliche Methode um festzustellen, ob es sich bei den T_E-Zellen um autoreaktive Zellen handelt, die gegen Epitope der β -Zellen des Pankreas gerichtet sind, wäre zudem die MHC-Tetramer Methode, wie sie von Moon *et al.* beschrieben wurde [68]. In Kombination mit der Verwendung magnetischer Beads zur Anreicherung der Zellen ist so eine Analyse selbst kleinster Zellpopulationen möglich. Im NOD-Modell des T1DM wurde diese Methode bereits erfolgreich angewandt, um die Verteilung und Anzahl antigenspezifischer autoreaktiver T-Zellen während der Entwicklung des T1DM zu untersuchen [19]. Bei dem hier durchgeführten Transferversuch wäre die Anwendung der MHC-Tetramer Methode zudem nicht nur zur Feststellung autoreaktiver T-Zellen nach dem Transfer geeignet. Auch für die weitere Analyse der autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen in den diabetischen Spendertieren wäre dies ein interessanter Ansatzpunkt. So könnte beispielsweise festgestellt werden, ob es sich bei dem Anstieg der T-Zellen im Knochenmark der diabetischen Tiere wirklich, wie vermutet, um autoreaktive T-Zellen handelt.

Nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere, ebenso wie nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen der Kontrolltiere konnte ein Anstieg des prozentualen Anteils der Granulozyten im Knochenmark beobachtet werden, der bei den diabetischen Tieren tendenziell ausgeprägter war als bei den nicht diabetischen Kontrolltieren (Abbildung 22). Dies spricht dafür, dass im Gegensatz zu den Beobachtungen von Monteiro *et al.*, die nur für CD4⁺ T-Zellen einen Einfluss auf die Granulopoese feststellen konnten [67], auch CD8⁺ T-Zellen die Bildung von Granulozyten im Knochenmark fördern. Dass CD8⁺ T-Zellen einen Einfluss auf die Hämatopoese haben können, zeigten Radinger *et al.* [78, 79]. Sie untersuchten den Einfluss von T-Zellen auf die Eosinopoese und fanden heraus, dass die Anzahl eosinophiler Granulozyten im Knochenmark CD8⁺ T-Zell-defizienter Knockout-Mäuse reduziert war. Im Knochenmark CD4⁺ T-Zell-defizienter Mäuse war hingegen kein Unterschied festzustellen. Darüber hinaus konnte der adoptive Transfer von CD8⁺ T-Zellen in immundefiziente SCID (severe combined immunodeficient)-Mäuse die normale Anzahl an Eosinophilen im Knochenmark wieder herstellen [15]. CD8⁺ T-Zellen tragen somit zu einer normalen Eosinopoese bei und könnten auch bei der Granulopoese eine wichtige Rolle spielen.

Der tendenziell stärkere Anstieg der Granulozyten bei den Tieren, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, könnte durch die *ex vivo* beobachtete gesteigerte IFN- γ Produktion der CD8⁺ CD44^{hi} T-Zellen der diabetischen Tiere erklärt werden (Abbildung 15), da IFN- γ , wie bereits beschrieben, einen Einfluss auf die Hämatopoese haben kann (vgl. Abschnitt 5.4.2).

Auch bei den DC in der Milz der Empfängertiere war nach dem CD8⁺ T-Zellen Transfer ein Anstieg der Anzahl der DC sowohl bei den diabetischen, als auch bei den Kontrolltieren zu beobachten. Dabei war die Zellzahl der DC bei den Tieren, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, etwas geringer, als bei den Tieren, die die T-Zellen der Kontrolltiere erhalten hatten (Abbildung 24A). Der Anstieg der Anzahl der DC in der Milz könnte ebenfalls für den Einfluss der CD8⁺ T-Zellen auf die Hämatopoese sprechen, da sie die Bildung der DC in gleicher Weise wie die der Granulozyten beeinflussen könnten und somit auch mehr DC in die peripheren lymphatischen Organe gelangen. Dass die Anzahl der DC bei den Tieren, die die diabetischen T-Zellen erhalten hatten, etwas geringer ausfällt, könnte wiederum ein Hinweis auf den Einfluss des T1DM auf die Myelopoese sein. Es wären jedoch auch andere Mechanismen denkbar, um einen Anstieg der DC in der Milz zu erklären. Da CD8⁺ T-Zellen auch Einfluss auf andere Zellen des Immunsystems haben, könnte ihr Erscheinen in der Milz nach dem Transfer molekulare Mechanismen auslösen, die die Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine zur Folge hätte. Dies könnte dazu führen, dass vermehrt DC-Vorläuferzellen in die Milz geleitet werden und dort schließlich zu DC differenzieren.

Neben dem Anstieg der Anzahl der DC in der Milz der Empfängertiere, führte der Transfer der CD8⁺ T-Zellen darüber hinaus zu einer höheren Expression kostimulatorischer Moleküle auf den DC (Abbildung 25). Da es bei der Expression keinen Unterschied zwischen den Tieren, die die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen oder nicht diabetischen Tiere erhalten hatten, gab, scheinen CD8⁺ T-Zellen allgemein einen Einfluss auf die Reifung der dendritischen Zellen zu haben.

Die DC aus der Milz der Empfängertiere zeigten, nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere, einen Phänotyp mit tendenziell verminderter Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und TNF- α und einer vermehrten Expression des antiinflammatorischen IL-10 (Abbildung 26). Sie weisen somit ein ähnliches Zytokinprofil auf, wie es bereits bei den DC diabetischer Tiere beobachtet werden konnte (Abbildung 9). Dies spricht für die Hypothese, dass die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere die Funktion der DC in Richtung des beschriebenen dysfunktionalen Phänotyps beeinflussen.

Im Gegensatz zu den DC aus der Milz der Empfängertiere war die Expression kostimulatorischer Moleküle bei den BMDC der Empfängertiere nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen unverändert (Abbildung 27). Auffällig war jedoch, dass die BMDC der Tiere, die keine CD8⁺ T-Zellen erhalten hatten, nach Stimulation mit CpG, bei allen untersuchten Zytokinen eine höhere Expression aufwiesen als die BMDC, die die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen oder nicht diabetischen Tiere erhalten hatten. Diese Veränderungen in der Zytokinproduktion der BMDC der Empfängertiere zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen die Differenzierung der DC beeinflussten und so an der Regulation der Zytokinproduktion der DC beteiligt waren. Dabei könnte IFN- γ bei der Differenzierung der DC eine Rolle spielen, wie durch weitere Arbeiten der Gruppe im Zusammenhang mit dem CLP-Modell deutlich wird. Hier kam es nach dem Transfer von TLR2^{-/-} CD8⁺ T-Zellen, die eine höhere IFN- γ Expression als WT CD8⁺ T-Zellen aufweisen, bei den BMDC der Empfängertiere zu einer Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung einer antiinflammatorischen Antwort.

Außerdem zeigte eine Analyse der Genexpression der Knochenmarkszellen, dass der Transfer der TLR2^{-/-} CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark der Empfängertiere zu einer verstärkten Expression von Genen führte, die an dem Signalweg der IFN- γ Antwort beteiligt sind, was die Hypothese stützt, dass IFN- γ die Differenzierung beeinflusst [8]. Diese Ergebnisse der Arbeitsgruppe stützen somit die Hypothese, dass auch die IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere die Differenzierung der DC beeinflussen könnten. Welche Rolle IFN- γ dabei hat bzw. über welche Mechanismen es wirkt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Dass die BMDC der Empfängertiere der CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere nur eine leicht erhöhte IL-10 Produktion gegenüber den BMDC der Kontrolltiere aufwiesen, steht dabei nicht im Widerspruch, da in diesem Versuchsansatz die verschiedenen Variablen, wie z.B. die

Dauer des T1DM, die Einfluss auf die Wirkung der T-Zellen auf die DC haben könnten, bisher nicht berücksichtigt wurden.

Um den Einfluss der T-Zellen auf die Differenzierung der DC genauer untersuchen zu können, wäre es für weitere Versuche daher sinnvoll, die verschiedenen Parameter, die in diesem Versuchsansatz relevant sein könnten, weiter zu betrachten. Zu diesen Parametern zählt beispielsweise die Dauer des T1DM bei den Spendertieren. Die Analyse der Zytokinproduktion der DC aus der Milz der diabetischen Tiere zeigte, dass der dysfunktionale Phänotyp der DC in Zusammenhang mit der Dauer der Erkrankung stand. Er war umso stärker ausgeprägt, je länger der T1DM andauerte (Abbildung 9). Da hier für die Entnahme der CD8⁺ T-Zellen bisher nur ein Zeitpunkt von acht Wochen nach der Induktion des Diabetes gewählt wurde, wäre es also interessant, diesen Zeitpunkt zu variieren und CD8⁺ T-Zellen von Tieren zu transferieren, die beispielsweise bereits seit 12 Wochen diabetisch sind. Darüber hinaus könnte auch der Zeitraum nach dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde ein Zeitraum von zwei Wochen gewählt. Es wäre daher interessant welche Ergebnisse eine Ausweitung des Zeitraums auf beispielsweise drei oder vier Wochen nach Transfer hätte. Ein weiterer Parameter wäre auch die Anzahl der transferierten T-Zellen. Diese wurde bisher nicht verändert. Es wäre also interessant, die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen zu erhöhen, um die Auswirkungen im Empfängertier zu untersuchen.

Zudem besteht die Möglichkeit, dass die CD8⁺ T-Zellen zwar auf die Differenzierung der DC wirken, es sich jedoch nicht um einen direkten Einfluss handelt. So bleibt auch die Beteiligung weiterer Zellen des Immunsystems, über die die CD8⁺ T-Zellen indirekt auf die Differenzierung der DC wirken könnten, zu klären.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere einen Einfluss auf die Funktion und Differenzierung der DC haben. Dabei beeinflussen sie die Zytokinproduktion der DC hin zu einem immunsuppressiven Phänotyp mit erhöhter IL-10 und verminderter IL-12 Produktion und könnten so zu der erhöhten Anfälligkeit diabetischer Tiere gegenüber Infektionen beitragen. Die genauen Mechanismen, über die die CD8⁺ T-Zellen auf die Funktion und Differenzierung der DC wirken, bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Autoreaktive CD8⁺ T-Zellen spielen während des Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) eine entscheidende Rolle, da sie die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas angreifen und zerstören. Patienten, die an T1DM erkrankt sind, zeigen eine höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen. Eine Sepsis ist eine systemische Infektion, bei der es neben der anfänglichen Hyperinflammation zu einer Immunsuppression kommt, an der dysfunktionale dendritische Zellen (DC) beteiligt sind. Nach Stimulation sezernieren sie größere Mengen des antiinflammatorischen IL-10 und geringere Mengen des proinflammatorischen IL-12. Die Dysfunktion ist dabei durch eine veränderte Differenzierung der DC im Knochenmark bedingt. In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob T1DM die beobachtete Immunsuppression während der Sepsis verstärkt. Außerdem sollte untersucht werden inwieweit CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere die Funktion und Differenzierung der DC beeinflussen. Unter Verwendung des Low-Dose Streptozotocin-Protokolls wurde T1DM sowohl in C57BL/6- als auch in NMRI-Mäusen induziert. Um die Auswirkungen des T1DM im Hinblick auf die erhöhte Anfälligkeit der Tiere gegenüber einer Sepsis zu untersuchen, wurde zudem das Modell der zökalen Ligation und Punktion (CLP) angewandt.

Die Versuche bestätigten die erhöhte Anfälligkeit diabetischer Tiere gegenüber einer Sepsis im CLP-Modell. Darüber hinaus zeigten die, aus dem Knochenmark diabetischer Tiere isolierten, DC (BMDC) nach Stimulation eine erhöhte IL-10 Produktion. Dieser dysfunktionale Phänotyp wurde durch die CLP noch verstärkt. DC aus der Milz diabetischer Tiere sezernierten nach Stimulation ebenfalls mehr IL-10 und weniger IL-12 als die DC der Kontrolltiere. Die Anzahl CD8⁺ CD62L⁻ CD44^{hi} T-Effektorzellen (T_E) war sowohl in der Milz als auch im Knochenmark der diabetischen Tiere erhöht. Außerdem exprimierten CD8⁺ CD44^{hi} T-Zellen, isoliert aus der Milz der diabetischen Tiere, *ex vivo* konstitutiv IFN- γ . Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die CD8⁺ T-Zellen der diabetischen Tiere die Funktion und Differenzierung der DC beeinflussen könnten. *In vitro* hatten die CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere Einfluss auf naive BMDC und führten zu einer Zytokinproduktion, die dem beschriebenen dysfunktionalen Phänotyp ähnelte. *In vivo* differenzierten die CD8⁺ T-Zellen, nach dem Transfer in T-Zell defiziente NMRI-*Foxn1*^{nu}-Mäuse, hauptsächlich zu CD8⁺ CD62L⁻ CD44^{hi} T_E-Zellen. Darüber hinaus war die Anzahl der Granulozyten im Knochenmark sowie der DC in der Milz der Empfängertiere erhöht. Dies deutet darauf hin, dass CD8⁺ T-Zellen die Hämatopoese beeinflussen. Zudem zeigten die DC der Mäuse, die die T-Zellen der diabetischen Tiere erhalten hatten, eine tendenziell höhere IL-10 und geringere IL-12 Produktion. Auch die BMDC der Empfängertiere zeigten eine veränderte Zytokinproduktion, was für einen Einfluss der T-Zellen auf die Differenzierung der DC spricht. Somit begünstigen CD8⁺ T-Zellen diabetischer Tiere die Differenzierung von DC mit einem immunsuppressiven Phänotyp, der das Risiko für Infektionen erhöhen könnte.

Abstract

Autoreactive CD8⁺ T cells play an important role during type 1 diabetes mellitus (T1DM) by destroying insulin producing β -cells in the pancreas. Patients suffering from T1DM show an enhanced risk for infections. Sepsis is a systemic infection characterized by an initial hyperinflammation and concomitant immunosuppression. Recent studies identified dysfunctional dendritic cells (DC) contributing to this immunosuppressive state showing decreased IL-12 and increased IL-10 production. This dysfunction originates in an altered differentiation of DC in the bone marrow. Aim of the present study was to investigate whether T1DM enhances the observed immunosuppression during polymicrobial sepsis. Furthermore, the question should be addressed to what extent CD8⁺ T cells of diabetic mice modulate the function and differentiation of DC and might contribute to the enhanced susceptibility to infection. For this purpose, T1DM was induced in C57Bl/6 or NMRI mice according to the low-dose streptozotocin protocol. The cecal ligation and puncture (CLP) model was used to analyze the impact of T1DM on the enhanced susceptibility of diabetic mice to sepsis.

The results confirmed the enhanced susceptibility to infection of diabetic mice in the CLP model. Furthermore, bone marrow derived dendritic cells (BMDC) from diabetic mice showed an elevated IL-10 expression which was increased after CLP. Spleen-derived DC from diabetic mice also showed the dysfunctional phenotype expressing higher amounts of IL-10 and reduced amounts of IL-12 after stimulation. The number of CD8⁺ CD62L⁻ CD44^{hi} effector T cells was elevated in the spleen and bone marrow of diabetic mice. Additionally, CD8⁺ CD44^{hi} T cells isolated from the spleen of diabetic mice showed a constitutive IFN- γ expression *ex vivo*. These results corroborate the hypothesis, that CD8⁺ T cells from diabetic mice have an influence on the DC function and might contribute to an altered differentiation in the bone marrow. CD8⁺ T cells from diabetic mice modulated naive BMDC towards the dysfunctional phenotype *in vitro*. Adoptive transfer of CD8⁺ T cells from diabetic mice into T cell-deficient NMRI-*Foxn1*^{nu} mice revealed the proliferation of CD8⁺ T cells to mainly CD8⁺ CD44^{hi} CD62L⁻ T_E- cells. The number of granulocytes in the bone marrow as well as the number of DC in the spleen was increased indicating an influence of CD8⁺ T cells on hematopoiesis. Furthermore, DC from mice which had received T cells from diabetic mice showed a tendency to higher expression of IL-10 and lower expression of IL-12. Moreover, BMDC from recipient mice showed an altered cytokine production indicating an impact of CD8⁺ T cells on DC differentiation. Thus, CD8⁺ T cells from diabetic mice favor the differentiation of DC with an immunosuppressive phenotype that might increase the risk for opportunistic infections.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams, N.M., S. Grassmann, and J.C. Sun, *Clonal expansion of innate and adaptive lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(11): p. 694-707.
2. Ahmed, M., et al., *Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naive CD8 T cell repertoire of aged mice*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 784-92.
3. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
4. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
5. Alli, R.S. and A. Khar, *Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function*. FEBS Lett, 2004. **559**(1-3): p. 71-6.
6. Alves-Filho, J.C., F. Spiller, and F.Q. Cunha, *Neutrophil paralysis in sepsis*. Shock, 2010. **34 Suppl 1**: p. 15-21.
7. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
8. Antoni, A.C., et al., *TLR2-induced CD8(+) T-cell deactivation shapes dendritic cell differentiation in the bone marrow during sepsis*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 945409.
9. Ardavin, C., et al., *Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 761-3.
10. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 69-82.
11. Baldridge, M.T., et al., *Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 793-7.
12. Barber, A.J., et al., *The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(6): p. 2210-8.
13. Beissert, S., A. Schwarz, and T. Schwarz, *Regulatory T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 15-24.
14. Benjamim, C.F., C.M. Hogaboam, and S.L. Kunkel, *The chronic consequences of severe sepsis*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 408-12.
15. Bonomo, A., et al., *A T Cell View of the Bone Marrow*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 184.
16. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
17. Burahmah, J., D. Zheng, and R.D. Leslie, *Adult-onset type 1 diabetes: A changing perspective*. Eur J Intern Med, 2022. **104**: p. 7-12.
18. Carlos, D., et al., *Histamine h2 receptor signaling in the pathogenesis of sepsis: studies in a murine diabetes model*. J Immunol, 2013. **191**(3): p. 1373-82.
19. Chee, J., et al., *Effector-memory T cells develop in islets and report islet pathology in type 1 diabetes*. J Immunol, 2014. **192**(2): p. 572-80.
20. Chen, D., et al., *Mouse Models of Autoimmune Diabetes: The Nonobese Diabetic (NOD) Mouse*. Methods Mol Biol, 2020. **2128**: p. 87-92.
21. de Bruin, A.M., et al., *Interferon-gamma impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice*. Blood, 2013. **121**(18): p. 3578-85.
22. de Bruin, A.M., C. Voermans, and M.A. Nolte, *Impact of interferon-gamma on hematopoiesis*. Blood, 2014. **124**(16): p. 2479-86.
23. Debczynski, W. and Z. Pietruska, *[Chemotaxis and spontaneous migration of neutrophil leukocytes from patients with diabetes]*. Pol Tyg Lek, 1994. **49**(1-3): p. 11-3.
24. Delano, M.J. and P.A. Ward, *The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome*. Immunological reviews, 2016. **274**(1): p. 330-353.
25. Di Rosa, F. and T. Gebhardt, *Bone Marrow T Cells and the Integrated Functions of Recirculating and Tissue-Resident Memory T Cells*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 51.
26. Duan, T., et al., *Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 812774.
27. Enee, E., et al., *ZnT8 is a major CD8+ T cell-recognized autoantigen in pediatric type 1 diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(7): p. 1779-84.

28. Esper, A.M., et al., *The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis*. Crit Care Med, 2006. **34**(10): p. 2576-82.
29. Ferlazzo, G. and B. Morandi, *Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 159.
30. Filgueiras, L.R., et al., *Leukotriene B4-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes*. Sci Signal, 2015. **8**(361): p. ra10.
31. Fleischmann-Struzek, C., et al., *Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis*. Intensive Care Med, 2020. **46**(8): p. 1552-1562.
32. Flohe, S.B., et al., *Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(3): p. 473-81.
33. Ganz, T. and R.I. Lehrer, *Antimicrobial peptides of vertebrates*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(1): p. 41-4.
34. Harreiter, J. and M. Roden, *[Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023)]*. Wien Klin Wochenschr, 2023. **135**(Suppl 1): p. 7-17.
35. Hickman, S.P. and L.A. Turka, *Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1461): p. 1713-21.
36. Holt, R.I.G., et al., *The Management of Type 1 Diabetes in Adults. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. Diabetes Care, 2021. **44**(11): p. 2589-2625.
37. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy*. Nature reviews. Immunology, 2013. **13**(12): p. 862-874.
38. Huang, J., et al., *Neutrophils in type 1 diabetes*. J Diabetes Investig, 2016. **7**(5): p. 652-63.
39. Huang, Y., et al., *Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis*. BMJ, 2016. **355**: p. i5953.
40. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
41. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
42. Jansen, A., M. van Hagen, and H.A. Drexhage, *Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes*. Lancet, 1995. **345**(8948): p. 491-2.
43. Jun, H.S., L.Y. Khil, and J.W. Yoon, *Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(11): p. 1892-901.
44. Kambayashi, T., et al., *Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2399-408.
45. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
46. Khan, F.U., et al., *Dendritic Cells and Their Immunotherapeutic Potential for Treating Type 1 Diabetes*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(9).
47. Kim, Y.T. and C. Steinberg, *Immunologic studies on the induction of diabetes in experimental animals. Cellular basis for the induction of diabetes by streptozotocin*. Diabetes, 1984. **33**(8): p. 771-7.
48. Kolliniati, O., et al., *Metabolic Regulation of Macrophage Activation*. J Innate Immun, 2022. **14**(1): p. 51-68.
49. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-72.
50. Kuhns, M.S., M.M. Davis, and K.C. Garcia, *Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 133-9.
51. Langerhans, P., *Über die Nerven der menschlichen Haut*. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin, 1868. **44**: p. 325-337.

52. Langmuir, P.B., et al., *Bone marrow abnormalities in the non-obese diabetic mouse*. Int Immunol, 1993. **5**(2): p. 169-77.
53. Lee, M., A.Y. Kim, and Y. Kang, *Defects in the differentiation and function of bone marrow-derived dendritic cells in non-obese diabetic mice*. J Korean Med Sci, 2000. **15**(2): p. 217-23.
54. Lee, Y.Y., et al., *Type 1 Diabetes Induces Hearing Loss: Functional and Histological Findings in An Akita Mouse Model*. Biomedicines, 2020. **8**(9).
55. Leslie, R.D., et al., *Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges*. Diabetes Care, 2021. **44**(11): p. 2449-2456.
56. Li, R., et al., *Bone marrow is a preferential homing site for autoreactive T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2251-9.
57. Lind, E.F., et al., *Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 127-34.
58. Lotta, L.A., et al., *Definitions of Metabolic Health and Risk of Future Type 2 Diabetes in BMI Categories: A Systematic Review and Network Meta-analysis*. Diabetes Care, 2015. **38**(11): p. 2177-87.
59. Luan, Y.Y., et al., *Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis*. J Interferon Cytokine Res, 2015. **35**(1): p. 17-22.
60. Mailliard, R.B., et al., *Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses*. J Exp Med, 2002. **195**(4): p. 473-83.
61. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3333-41.
62. Marin-Gallen, S., et al., *Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2010. **160**(2): p. 207-14.
63. Martens, G.W., et al., *Tuberculosis susceptibility of diabetic mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(5): p. 518-24.
64. Mensah-Brown, E.P., et al., *IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin*. Eur J Immunol, 2006. **36**(1): p. 216-23.
65. Merad, M., et al., *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 563-604.
66. Miles, J.M. and J.E. Gerich, *Glucose and ketone body kinetics in diabetic ketoacidosis*. Clin Endocrinol Metab, 1983. **12**(2): p. 303-19.
67. Monteiro, J.P., et al., *Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1484-91.
68. Moon, J.J., et al., *Tracking epitope-specific T cells*. Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 565-81.
69. Morath, A. and W.W. Schamel, *alphabeta and gammadelta T cell receptors: Similar but different*. J Leukoc Biol, 2020. **107**(6): p. 1045-1055.
70. Mueller, S.N., et al., *Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 137-61.
71. Murphey, K. and C. Weaver, *Janeway Immunologie*. Vol. 9. Auflage. 2018, Berlin: Springer-Verlag.
72. Naik, S.H., et al., *Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 663-71.
73. Nakajima, Y., et al., *Critical role of the CD44(low)CD62L(low) CD8(+) T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(23).
74. Nolz, J.C., G.R. Starbeck-Miller, and J.T. Harty, *Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions*. Immunotherapy, 2011. **3**(10): p. 1223-33.
75. Osuchowski, M.F., et al., *Untreated type 1 diabetes increases sepsis-induced mortality without inducing a prelethal cytokine response*. Shock, 2010. **34**(4): p. 369-76.

76. Pastille, E., et al., *Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 977-86.
77. Poehlmann, H., et al., *Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis*. Crit Care, 2009. **13**(4): p. R119.
78. Radinger, M., et al., *Regulation of allergen-induced bone marrow eosinophilopoiesis: role of CD4+ and CD8+ T cells*. Allergy, 2007. **62**(12): p. 1410-8.
79. Radinger, M., et al., *Regulatory role of CD8+ T lymphocytes in bone marrow eosinophilopoiesis*. Respir Res, 2006. **7**(1): p. 83.
80. Rahmel, T., et al., *Long-term mortality and outcome in hospital survivors of septic shock, sepsis, and severe infections: The importance of aftercare*. PLoS One, 2020. **15**(2): p. e0228952.
81. Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward, *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 776-87.
82. Rudd, K.E., et al., *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study*. Lancet, 2020. **395**(10219): p. 200-211.
83. Saravia, J., N.M. Chapman, and H. Chi, *Helper T cell differentiation*. Cell Mol Immunol, 2019. **16**(7): p. 634-643.
84. Schurch, C.M., C. Riether, and A.F. Ochsenbein, *Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(4): p. 460-72.
85. Schwarz, B.A. and A. Bhandoola, *Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 47-57.
86. Serreze, D.V., H.R. Gaskins, and E.H. Leiter, *Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice*. J Immunol, 1993. **150**(6): p. 2534-43.
87. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
88. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-810.
89. Soudja, S.M., et al., *Memory-T-cell-derived interferon-gamma instructs potent innate cell activation for protective immunity*. Immunity, 2014. **40**(6): p. 974-88.
90. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
91. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands?* J Exp Med, 2000. **192**(4): p. F9-F14.
92. Takahashi, K., M.C. Honeyman, and L.C. Harrison, *Impaired yield, phenotype, and function of monocyte-derived dendritic cells in humans at risk for insulin-dependent diabetes*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2629-35.
93. Takizawa, H., S. Boettcher, and M.G. Manz, *Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation*. Blood, 2012. **119**(13): p. 2991-3002.
94. Tan, J.T., et al., *Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1523-32.
95. Tinsley, K.W., et al., *Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 909-14.
96. Trevelin, S.C., et al., *Diabetes Mellitus and Sepsis: A Challenging Association*. Shock, 2017. **47**(3): p. 276-287.
97. Tsai, S., A. Shameli, and P. Santamaria, *CD8+ T cells in type 1 diabetes*. Adv Immunol, 2008. **100**: p. 79-124.
98. Tsioumpekou, M., et al., *The Role of Cytokines in Neutrophil Development, Tissue Homing, Function and Plasticity in Health and Disease*. Cells, 2023. **12**(15).

99. Unger, W.W., et al., *Discovery of low-affinity preproinsulin epitopes and detection of autoreactive CD8 T-cells using combinatorial MHC multimers*. J Autoimmun, 2011. **37**(3): p. 151-9.
100. Valerius, N.H., et al., *Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus*. Acta Med Scand, 1982. **211**(6): p. 463-7.
101. Viglietta, V., et al., *GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes*. J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 895-903.
102. Vremec, D., et al., *CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2978-86.
103. Wan, Y.Y., *Multi-tasking of helper T cells*. Immunology, 2010. **130**(2): p. 166-71.
104. Watanabe, S., et al., *The role of macrophages in the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2019. **129**(7): p. 2619-2628.
105. Weycker, D., et al., *Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis*. Crit Care Med, 2003. **31**(9): p. 2316-23.
106. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal*. J Surg Res, 1980. **29**(2): p. 189-201.
107. Wolfsdorf, J., et al., *Diabetic ketoacidosis in children and adolescents with diabetes*. Pediatr Diabetes, 2009. **10 Suppl 12**: p. 118-33.
108. Wong, F.S., et al., *CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 67-76.
109. Yagi, H., et al., *Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice*. Eur J Immunol, 1992. **22**(9): p. 2387-93.
110. Yende, S., et al., *Long-Term Quality of Life Among Survivors of Severe Sepsis: Analyses of Two International Trials*. Crit Care Med, 2016. **44**(8): p. 1461-7.
111. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
112. Zuniga-Pflucker, J.C., *T-cell development made simple*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 67-72.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
APC	antigen presenting cell
BM	bone marrow
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
CBA	Cytometric Bead Array
CD	cluster of differentiation
cDC	conventional dendritic cell
CDP	common DC precursor
CFDA SE	Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidylester
CFU	colony forming units
CLP	common lymphoid progenitor
CLP	cecal ligation and puncture
CMP	common myeloid progenitor
CpG	unmethylierte Cytosin-phosphat-Guanin (CpG)-Dinukleotide
d	Tage
DAMPs	danger-associated molecular patterns
DC	dendritic cell
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	forward-scatter
G	Gauge
GAD	Glutamat Decarboxylase
GDM	Gestationsdiabetes mellitus

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSC	hematopoetic stem cell
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
l	Liter
LMPPs	lymphoid-primed multipotent progenitors
LPS	Lipopolysaccharid
MDP	macrophage-DC precursor
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MoDC	aus Monozyten differenzierte dendritische Zelle
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NMRI	Naval Medical Research Institute
NOD	non obese diabetic (Maus)
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetat
PRR	pathogen recognition receptor
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute

SD	standard deviation
sek	Sekunden
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOFA-Score	Sequential Organ Failure Assessment Score
SSC	sideways-scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
STZ	Streptozotocin
T1DM / T2DM	Typ 1 Diabetes mellitus / Typ 2 Diabetes mellitus
T _{CM}	Central Memory T-Zelle
TCR	T cell receptor
T _E	Effektor T-Zelle
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
T _N	naive T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
VLE RPMI	very low endotoxin RPMI

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Subpopulationen der dendritischen Zellen (adaptiert nach Khan <i>et al.</i> [46]).	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der T-Zellsubpopulationen.	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Behandlung mit Streptozotocin zur Induktion des T1DM.	27
Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Durchführung des CD8 ⁺ T-Zell-Transfers.	28
Abbildung 5: Induktion des Diabetes in C57BL/6- oder NMRI-Mäusen durch Gabe von Streptozotocin.	36
Abbildung 6: Induktion der Sepsis in Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen unter Verwendung des CLP-Modells.	38
Abbildung 7: Charakterisierung der BMDC von Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen (nach CLP- oder Sham-Operation) in Kultur.	39
Abbildung 8: IL-10 Produktion der BMDC von Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen in Kultur.	40
Abbildung 9: Analyse der Zytokinproduktion der DC isoliert aus der Milz von Kontrolltieren und diabetischen C57BL/6-Mäusen.	41
Abbildung 10: Zytokinproduktion naiver BMDC nach Co-Kultur mit T-Zellen isoliert aus der Milz von Kontrolltieren oder diabetischen C57BL/6-Mäusen.	43
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Analyse der Zellen der Spendertiere.	45
Abbildung 12: Anzahl der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in Milz und Knochenmark von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren.	46
Abbildung 13: CD25 Expression der T-Zellen von Kontrolltieren oder diabetischen NMRI-Mäusen als Aktivitätsmarker.	48
Abbildung 14: Zusammensetzung der CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen in Milz und Knochenmark von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren.	50
Abbildung 15: IFN- γ Expression der CD8 ⁺ T-Zellen diabetischer NMRI-Mäuse und Kontrolltiere.	52
Abbildung 16: DC-Subpopulationen in der Milz der diabetischen NMRI-Mäuse und Kontrolltiere.	54
Abbildung 17: Analyse der CD40 ⁺ und CD86 ⁺ Expression der DC aus der Milz von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren als Marker für deren Aktivierung.	55
Abbildung 18: Analyse der CD40 und CD86 Expression der BMDC von diabetischen NMRI-Mäusen und Kontrolltieren als Marker für deren Aktivierung.	56
Abbildung 19: Transfer naiver CD8 ⁺ T-Zellen in NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse.	57
Abbildung 20: Proliferation naiver CD8 ⁺ T-Zellen nach Transfer in NMRI- <i>Foxn1^{nu}</i> -Mäuse.	58

Abbildung 21: Schematische Darstellung der Analyse der Zellen der Empfängertiere.....	59
Abbildung 22: Anstieg der Granulozytenzahl im Knochenmark der Empfängertiere nach..... CD8 ⁺ T-Zell-Transfer.	60
Abbildung 23: Zusammensetzung der CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen in Milz und Knochenmark der Empfängertiere nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer.	62
Abbildung 24: DC-Subpopulationen in der Milz der Empfängertiere nach CD8 ⁺ T-Zell- Transfer.	63
Abbildung 25: Analyse der CD40 und CD86 Expression der DC aus der Milz der Empfängertiere nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer.	65
Abbildung 26: Zytokinprofil der DC aus der Milz der Empfängertiere nach CD8 ⁺ T-Zell- Transfer.	66
Abbildung 27: Analyse der CD40 und CD86 Expression der BMDC der Empfängertiere..... nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer.....	68
Abbildung 28: Zytokinprofil der BMDC der Empfängertiere nach CD8 ⁺ T-Zell-Transfer.....	69

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Zellkulturmedien	21
Tabelle 2 - Reagenzien	22
Tabelle 3 - Puffer und Lösungen	23
Tabelle 4 - Kommerzielle Reaktionssysteme und Reagenziensätze	23
Tabelle 5 - Antikörper	24
Tabelle 6 - Geräte	25
Tabelle 7 - Software	25

8.4 Danksagung

Manchmal verläuft der Weg, den man eingeschlagen hat, nicht so gradlinig, wie man es sich ursprünglich erhofft hat und man muss Hürden im Leben überwinden, die einen viel Kraft und Zeit kosten.

Als erstes möchte ich daher Stefanie Flohé nicht nur für die sehr gute Betreuung, sondern besonders für ihre verständnisvolle Unterstützung danken. Astrid Westendorf danke ich für die Zweitbetreuung im Rahmen des RTG 1949.

Ein großer Dank geht auch an die Mädels der Arbeitsgruppe, die mich während meiner Doktorandenzeit im Labor und darüber hinaus begleitet haben. Ein besonderer Dank geht dabei an Anna Smirnov, nicht nur für ihre Mithilfe bei den Experimenten und die angeregten Diskussionen über Ergebnisse, sondern auch für die freundschaftlichen Gespräche. Ebenso möchte ich Michaela Bak für ihre unentbehrliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken. Außerdem geht mein Dank an Samantha Gardiasch für ihre Mithilfe bei der Betreuung der diabetischen Mäuschen sowie an Lea Picard für den fachlichen Austausch und das Korrekturlesen. Für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor danke ich zudem Marion Frisch, Monika Gambusz und Heike Rekasi. Darüber hinaus möchte ich Stephanie Pohlmann für die gute Einarbeitung und Eva Pastille für Rat und Tat danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden, vor allem bei meinen Kölner Mädels und dem Coach, die in den letzten Jahren viel Verständnis aufgebracht haben und immer für mich da waren. Ich bin so dankbar, dass ich euch habe! Zuletzt geht ein ganz besonderer Dank an meinen Partner, Fabian Höver (†), der mich über 15 Jahre auf meinem Lebensweg begleitet und stets ermutigt hat, trotz aller Widrigkeiten, an meinen Zielen festzuhalten. Ihm möchte ich daher diese Arbeit widmen.

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.6 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Der Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Funktion und Differenzierung dendritischer Zellen während des Typ 1 Diabetes mellitus*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Melanie Nehring befürworte.

Essen, _____
Prof. Dr. Stefanie Flohé

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst, mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, _____
Melanie Nehring

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, _____
Melanie Nehring