

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke



**Anzahl und Funktion natürlicher Killerzellen
in Risikogruppen für Typ-2-Diabetes**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Julia Beck, geb. Keilen

aus
Trier

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Andreas Lechner

Mitberichterstatter: PD Dr. Rui Wang-Sattler
Prof. Dr. Cornelia Then

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Christina Gar

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2025

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 2017 bis Oktober 2018 in der Abteilung Diabetologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

(Direktor: Herr Prof. Dr. med. Martin Reincke)

Aus der Dissertation ging folgende Originalarbeit als Veröffentlichung hervor:

Keilen J, Gar C, Rottenkolber M, Fueessl LU, Joseph AT, Draenert R, Seissler J, Lechner A. No association of natural killer cell number and function in peripheral blood with overweight/obesity and metabolic syndrome in a cohort of young women. *Physiol Rep.* 2022 Feb;10(4):e15148. doi: 10.14814/phy2.15148. PMID: 35179822; PMCID: PMC8855889.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.1	Klassifizierung und Diagnosestellung	1
1.2	Risikogruppen für Typ-2-Diabetes	3
1.2.1	Prädiabetes	3
1.2.2	Gestationsdiabetes	3
1.2.3	Metabolisches Syndrom	4
1.3	Periphere mononukleäre Blutzellen	6
1.3.1	Natürliche Killerzellen	7
2	Zielsetzung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Studiendesign	10
3.1.1	PPSDiab-Kohorte	10
3.1.2	Einschlusskriterien	10
3.1.3	Ausschlusskriterien	11
3.2	Visitenablauf und Probengewinnung	11
3.2.1	Vorbereitung	11
3.2.2	Durchführung des oralen Glukosetoleranztests	11
3.2.3	Weitere Erhebungen	13
3.3	PBMC-Verarbeitung	13
3.3.1	Isolierung	13
3.3.2	Kryokonservierung und Aufbewahrung	14
3.3.3	Auftauen	14
3.4	Durchflusszytometrie	15
3.5	Anzahl und Aktivierung der NK-Zellen	16
3.5.1	Titration und Isotypkontrolle der Antikörper	16
3.5.2	Versuchsaufbau	17
3.5.3	Gatingstrategie	18
3.6	Funktion der NK-Zellen	20
3.6.1	Auftauen K562	20
3.6.2	Versuchsaufbau	20
3.6.3	Gatingstrategie	22

3.7	Berechnungen	23
3.8	Statistische Analysen	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Studienkohorte	26
4.2	NK-Zellen und GDM	29
4.3	NK-Zellen und Übergewicht/Adipositas	31
4.4	NK-Zellen und MetS	33
5	Diskussion	36
5.1	NK-Zellen bei Frauen nach GDM	36
5.2	NK-Zellen bei Übergewicht und MetS	37
5.2.1	Literaturvergleich - Anzahl und Aktivierung	37
5.2.2	Literaturvergleich - Funktion	39
5.3	Stärken und Schwächen der Arbeit	39
6	Zusammenfassung	41
7	Ausblick	42
8	Literaturverzeichnis	43
9	Danksagung	60
10	Anhang	61
10.1	Abkürzungsverzeichnis	61
10.2	Abbildungsverzeichnis	63
10.3	Tabellenverzeichnis	64
10.4	Materialliste der Blutentnahmen	65
11	Affidavit	66
12	Übereinstimmungserklärung	67

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine der häufigsten Volkskrankheiten der Welt und stellt das moderne Gesundheitswesen vor große Herausforderungen. Im Jahr 2022 lag die Zahl der Betroffenen allein in Deutschland bei etwa 8,5 Millionen [1]. Weltweit waren 537 Millionen der Erwachsenen im Alter von 20 bis 79 Jahren erkrankt, was einer Prävalenz von 10,5 % entspricht [2]. Diese Zahl soll bis 2045 auf 783 Millionen steigen [2]. Die zunehmende Prävalenz von Diabetes mellitus bringt sowohl individuelle als auch gesellschaftliche Folgen mit sich.

Zu den schwerwiegenden Komplikationen gehören unter anderem Amputationen, koronare Herzkrankheit und Schlaganfall sowie diabetische Nephro-, Retino- und Polyneuropathie [3]. Weltweit stirbt alle 5 Sekunden ein Mensch an den Folgen seines Diabetes [2]. Auch die wirtschaftliche Belastung ist enorm. Laut dem Statistischen Bundesamt lagen alleine die direkten Krankheitskosten in Deutschland im Jahr 2020 bei ungefähr 7,4 Milliarden Euro [4].

Angesichts der steigenden Prävalenz und der gravierenden individuellen und gesellschaftlichen Folgen ist es von entscheidender Bedeutung, ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie von Diabetes mellitus zu erlangen. Dadurch können Diagnosen früher gestellt, neue Therapiemöglichkeiten etabliert und Präventionsmaßnahmen effektiver gestaltet werden.

1.1.1 Klassifizierung und Diagnosestellung

Diabetes mellitus bezeichnet eine heterogene Krankheitsgruppe und kann in mehrere Untergruppen unterteilt werden [5]. Gemeinsam ist allen eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels (Hyperglykämie) [6]. Typ-2-Diabetes (T2D) ist die häufigste Form mit einem Anteil von 90 - 95 % [7]. Bei den erkrankten Personen

kommt es klassischerweise durch eine erhöhte Insulinresistenz zu einem relativen Insulinmangel [7]. Die Diagnose des Diabetes mellitus erfolgt anhand von Nüchternplasmaglukose (NPG), Gelegenheitsplasmaglukose (GPG), glykiertem Hämoglobin (HbA1c) oder oralem Glukosetoleranztest (oGTT) [8] (s. Tab. 1.1).

Tabelle 1.1: Diagnosekriterien Prädiabetes und Diabetes mellitus nach ADA und WHO [6, 7, 9]

	Prädiabetes (erhöhtes Diabetesrisiko)	Diabetes mellitus
NPG	ADA*: 100 - 125 mg/dl (5,6 - 6,9 mmol/l)	≥ 126 mg/dl** ($\geq 7,0$ mmol/l)
	WHO*: 110 - 125 mg/dl (6,1 - 6,9 mmol/l)	
2-h PG	140 - 199 mg/dl (7,8 - 11,0 mmol/l)	≥ 200 mg/dl** ($\geq 11,1$ mmol/l)
HbA1c	5,7 - 6,4 %	$\geq 6,5$ %**
GPG		≥ 200 mg/dl*** ($\geq 11,1$ mmol/l)

* ADA und WHO unterscheiden sich nur im Grenzwert der NPG für Prädiabetes

** an 2 Tagen *** an 2 Tagen oder an einem Tag + klassische Symptome

ADA: American Diabetes Association; GPG: Gelegenheitsplasmaglukose;

HbA1c: glykiertes Hämoglobin; NPG: Nüchternplasmaglukose; PG: Plasmaglukose;

WHO: World Health Organization

Typ-1-Diabetes (T1D) ist meist immunologisch vermittelt und zeichnet sich durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen des Pankreas aus [10]. Dies resultiert letztlich in einem absoluten Insulinmangel. Die Diagnosestellung erfolgt häufig im Kindesalter [10]. Der Latent Autoimmune Diabetes in the Adult (LADA) wird offiziell dem T1D zugeordnet, entwickelt sich jedoch meist erst im Erwachsenenalter und deutlich langsamer. Er ist sehr heterogen und weist phänotypisch und therapeutisch oft Ähnlichkeiten zum T2D auf. Er wird deshalb auch als „Double Diabetes“ bezeichnet [11].

1.2 Risikogruppen für Typ-2-Diabetes

1.2.1 Prädiabetes

Bei einem Prädiabetes liegen die Glukosewerte zwischen Normoglykämie und Diabetes (s. Tab. 1.1). Diese „Vorstufe“ von Diabetes geht bereits mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher [12]. Durch Lebensstilinterventionen wie Gewichtsreduktion oder sportliche Betätigung ist es möglich, eine Progression von Prädiabetes zu T2D zu verhindern [13]. Die Inzidenz von T2D ist nach Lebensstilintervention 58 % niedriger [14] und sogar eine Konversion zu normoglykämischen Werten kann erreicht werden [13]. Studien deuten darauf hin, dass diese Interventionen in frühen Stadien effektiver sind [15].

Deshalb ist es wichtig, Personen mit erhöhtem Risiko frühzeitig zu detektieren, damit diese von Präventions- oder Interventionsmaßnahmen bestmöglich profitieren können. Da viele Betroffene sogar im Anfangsstadium der manifesten Erkrankung nur milde Symptome aufweisen, wird T2D häufig erst nach Jahren diagnostiziert [2]. In Europa liegt der Anteil der Menschen mit undiagnostiziertem Diabetes schätzungsweise bei 35,7 % [2].

Trotz erwiesener Risikofaktoren wie Übergewicht, steigendem Alter oder familiärer Prädisposition, ist gerade die frühe Pathogenese des T2D noch nicht ausreichend erforscht [2]. Obwohl Adipositas als bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung von T2D gilt, gibt es auch übergewichtige Menschen, die nicht erkranken [16, 17]. Auf der anderen Seite zeigen mitunter auch schlanke Personen einen erhöhten Blutzuckerspiegel oder leiden an T2D [18–20]. Dies legt nahe, dass noch andere, bisher unbekannte Risikofaktoren und Mediatoren in der Pathophysiologie des T2D existieren müssen.

Es wird vermutet, dass das angeborene Immunsystem eine Rolle im Krankheitsverlauf spielen könnte, bisher konnte dies aber noch nicht endgültig bestätigt werden [21].

1.2.2 Gestationsdiabetes

Gestationsdiabetes (GDM) ist definiert als Glukosetoleranzstörung, die erstmals während der Schwangerschaft auftritt oder festgestellt wird [22]. Seit 2012 wird in der Mutterschafts-Richtlinie ein oGTT zum Screening eines möglichen GDM empfohlen [23]. Zwischen der 24. und 28. Schwangerschaftswoche wird

ein „Vortest“ mit 50 g Glukose durchgeführt, dem bei auffälligen Werten ein „Diagnosetest“ mit 75 g Glukose angeschlossen wird [23]. Bei letzterem sind die Grenzwerte der International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) maßgeblich (s. Tab. 1.2) [22, 24]. Ein pathologischer Wert ist zur Diagnosestellung ausreichend. Um einen manifesten Diabetes zu diagnostizieren, gelten die Grenzwerte gemäß Tabelle 1.1.

Tabelle 1.2: Diagnosekriterien Gestationsdiabetes nach IADPSG [22]

	Schwellenwert Glukose*
NPG	92 mg/dl (5,1 mmol/l)
1-h PG	180 mg/dl (10 mmol/l)
2-h PG	153 mg/dl (8,5 mmol/l)

* mindestens ein Wert muss zur Diagnosestellung erreicht oder überschritten werden.
 IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups;
 NPG: Nüchternplasmaglukose; PG: Plasmaglukose

Laut Robert-Koch-Institut wurde im Jahr 2021 bei 8,5 % der Frauen mit Klinikgeburt in Deutschland ein GDM diagnostiziert [25]. Neben einem erhöhten Geburtsrisiko für Mutter und Kind, haben Frauen nach GDM ein fast zehnfach höheres Risiko, einen T2D zu entwickeln, als Frauen mit normoglykämischer Schwangerschaft [29, 30].

Daher wird den Betroffenen 6 - 12 Wochen nach der Geburt ein erneuter 75 g oGTT empfohlen, bei dem die Normwerte gemäß WHO gelten (s. Tab. 1.1) [24]. Weitere Kontrollen sollten alle 1 - 3 Jahre durchgeführt werden, um einen Prädiabetes oder T2D frühzeitig zu erkennen [26]. Der Anteil der Frauen, die nach ihrem GDM eine postpartale Kontrolle wahrnehmen, ist jedoch gering und lag im GestDiab Register zwischen 2015 und 2017 nur bei 38,2 % [27]. Dabei entwickelt laut einer Metaanalyse von 2021 ein Drittel der Frauen nach GDM innerhalb von 15 Jahren einen Diabetes [28].

1.2.3 Metabolisches Syndrom

T2D, GDM und Metabolisches Syndrom (MetS) sind eng miteinander verwandt. GDM und MetS gelten beide als Risikofaktoren für die Entwicklung eines T2D [29–32]. Übergewicht als Komponente des MetS gilt aber auch als Risikofaktor für die Entwicklung eines GDM [33]. Auf der anderen Seite haben Frauen

nach GDM ein erhöhtes Risiko, im Verlauf ein MetS zu entwickeln [34].

In Deutschland leidet mehr als jeder fünfte Erwachsene am MetS [35]. Nach dem National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) umfasst das MetS fünf Kriterien: abdominale Adipositas (gemessen am Taillenumfang), erhöhte Triglyceride, erniedrigtes High-density Lipoprotein (HDL), erhöhter Blutdruck und erhöhte NPG (s. Tab. 1.3) [36].

Tabelle 1.3: Kriterien Metabolisches Syndrom nach NCEP ATP III [36, 37]

Kriterien	Messwert
Erhöhter Taillenumfang	Frauen: > 88 cm Männer: > 102 cm
HDL-Cholesterin	Frauen: < 50 mg/dl Männer: < 40 mg/dl
Triglyceride	≥ 150 mg/dl
NPG	≥ 100 mg/dl
Blutdruck	≥ 130 / ≥ 85 mmHg

HDL: High-density Lipoprotein; NPG: Nüchternplasmaglukose;
NCEP ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

Wenn drei der Punkte erfüllt sind, kann die Diagnose gestellt werden [36]. Das MetS stellt einen unabhängigen Prädiktor für die Entwicklung eines T2D dar [32] und erhöht das Risiko, daran zu erkranken um das Fünffache [31].

1.3 Periphere mononukleäre Blutzellen

Zu den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) gehören Lymphozyten, Monozyten und Dendritische Zellen [38]. Zur Isolation der PBMC aus dem Vollblut wird häufig die Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation angewandt [39]. Hierbei macht man sich zunutze, dass die Blutzellen nach Zentrifugation unterschiedliche Dichten im Ficoll-Hypaque Medium haben [40]. PBMC und Thrombozyten sammeln sich wegen ihrer niedrigeren Dichte in den oberen Schichten, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte absinken [40] (s. Abb. 1.1).

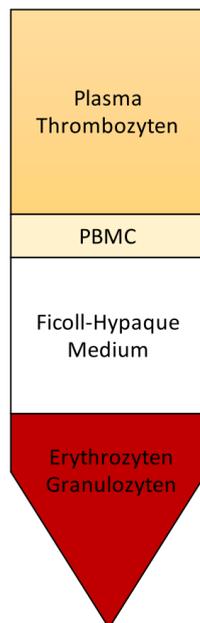


Abbildung 1.1: Schichten nach Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation [41]

PBMC: Periphere mononukleäre Blutzellen

Ein Vorteil der PBMC liegt vor allem darin, dass man sie kryokonservieren und zu einem späteren Zeitpunkt untersuchen kann [42]. Bei klinischen Studien mit zeitlich versetzten Endpunkten hat man so ein geringeres Risiko von Interassay-Variabilität, da man mehrere Proben zeitgleich auftauen und testen kann [41,42].

1.3.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zu den Leukozyten und machen 5 - 15 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus [43]. Ihr Anteil an den PBMC beträgt durchschnittlich 10 - 15 % [38].

Als wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems kommt ihnen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Viren und Tumorzellen zu [44]. NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, Zellen zu erkennen, die kein oder ein verändertes Major Histocompatibility Complex (MHC)-I-Molekül ausbilden [44, 45]. MHC-I ist ein Oberflächenmarker, der von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird und damit eine Art „Personalausweis“ des Körpers darstellt [46]. Mutierte Zellen, Tumorzellen sowie virusinfizierte Zellen können eine fehlende Expression dieses MHC-I-Komplexes aufweisen [44, 47]. Die „Missing-Self“-Hypothese besagt, dass NK-Zellen eben diese Zellen erkennen und eliminieren können [44].

Sie haben zudem eine immunregulierende Wirkung, indem sie verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine produzieren, wie beispielsweise Interferon-gamma (IFN- γ) [48, 49]. Bei zellulärem Stress können NK-Zellen durch die Sekretion von IFN- γ eine Makrophagen-Polarisation auslösen [50]. Diese Umwandlung von anti-inflammatorischen zu pro-inflammatorischen Makrophagen hat in einer Studie mit adipösen Mäusen zu Insulinresistenz geführt [51]. Ein Mangel an NK-Zellen in übergewichtigen Mäusen führte wiederum zu einer verbesserten Insulinsensitivität [51, 52].

Auf ihrer Zelloberfläche bilden NK-Zellen inhibierende und aktivierende Rezeptoren aus, die in ihrem Zusammenspiel die NK-Zell-Funktion regulieren [48]. Durch verschiedene Kombinationen dieser Rezeptoren, gibt es eine große Heterogenität innerhalb der NK-Zellen [48]. Dies führt zu der Annahme, dass sie in unterschiedlichsten pathologischen Konditionen in immunologische Prozesse eingreifen können [48]. Dabei werden ihnen sowohl protektive als auch pathogene Rollen in diversen Erkrankungen zugeschrieben, möglicherweise sogar in ein und derselben Krankheit während verschiedener Stadien [53].

NK-Zellen und Diabetes NK-Zellen stehen im Verdacht, an der Pathogenese des Diabetes beteiligt zu sein. Bei Erkrankten mit T2D, T1D oder LADA konnten quantitative und qualitative Veränderungen der NK-Zellen festgestellt werden [54–68]. In einer Hochrisikogruppe zur Entwicklung eines T1D konnte bereits vor Krankheitsbeginn ein erhöhter Anteil einer NK-Zell Subgruppe gemessen werden [69]. In Mäusen konnte das Entfernen der NK-Zellen in den

Langerhans-Inseln des Pankreas die Entwicklung eines Diabetes signifikant hemmen [70].

NK-Zellen und MetS Diverse Studien haben außerdem Auffälligkeiten der NK-Zahl oder -Aktivität bei Personen mit Übergewicht und MetS festgestellt. So waren häufig die Anzahl der NK-Zellen vermindert, die Funktion reduziert und Aktivierungsmarker vermehrt exprimiert [71–79]. Abgesehen vom MetS wurden auch Defizite in der Anzahl oder Funktion der NK-Zellen im Zusammenhang mit der Entwicklung und der Progression von Krebs berichtet [79, 80]. Diese Zellen könnten somit eine Erklärung für die erhöhte Inzidenz bestimmter Krebsarten bei Fettleibigkeit und MetS liefern.

2 Zielsetzung

T2D ist eine häufige und gefährliche Volkskrankheit, deren Ursachen noch nicht vollständig geklärt sind. NK-Zellen als wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems stehen im Verdacht, an der Pathogenese beteiligt zu sein. Viele der vorhandenen Studien über das MetS weisen jedoch niedrige Fallzahlen, widersprüchliche Ergebnisse sowie multimorbide Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer auf.

Die bisherigen Ergebnisse sollen deshalb in der großen, gut phänotypisierten PPSDiab-Kohorte überprüft werden.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es herauszufinden, ob NK-Zellen in verschiedenen Risikogruppen für T2D in Anzahl und Funktion verändert sind. Diese Risikogruppen sind:

- Probandinnen nach GDM,
- Probandinnen mit Übergewicht/Adipositas,
- Probandinnen mit MetS.

Im Detail werden folgende Charakteristika untersucht:

- die absolute sowie die relative Anzahl der NK-Zellen (als Anteil an den Lymphozyten) im peripheren Blut,
- der Oberflächenmarker CD69 als Indikator für den Aktivierungsgrad der NK-Zellen,
- das Vermögen der NK-Zellen, K562-Tumorzellen abzutöten, als Abbild für ihre Funktion.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei „Prädiktion, Prävention und Subklassifikation von Schwangerschafts- und Typ 2 Diabetes“ (PPSDiab) handelt es sich um eine prospektive, monozentrische Beobachtungsstudie [81].

3.1.1 PPSDiab-Kohorte

Zwischen November 2011 und Mai 2016 wurden 304 Studienteilnehmerinnen eingeschlossen [82]. Die Kohorte besteht aus Frauen mit einem GDM in ihrer letzten Schwangerschaft und einer Kontrollgruppe von Probandinnen, die eine normoglykämie Schwangerschaft hatten. Sie wurden im Verhältnis 2:1 konsekutiv durch das Diabeteszentrum und die Abteilung für Geburtshilfe des Klinikums der Universität München rekrutiert. Einverständniserklärungen von allen Studienteilnehmerinnen sowie die Befürwortung des Studienprotokolls von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München liegen vor (Studien-ID 300-11).

3.1.2 Einschlusskriterien

Die Einschlusskriterien beinhalteten, dass die Schwangerschaft mindestens 3 und höchstens 16 Monate zurücklag und es sich um eine Lebendgeburt mit Einling (n=295) oder Zwillingen (n=9) handelte. Die Diagnose des GDM basierte auf einem 75 g oGTT nach der 23. Schwangerschaftswoche. Die Grenzwerte zur Diagnosestellung entsprachen den Empfehlungen der IADPSG (s. Tab. 1.2) [22]. Die Kontrollen wiesen entweder einen unauffälligen 75 g oGTT auf oder hatten einen 50 g oGTT mit einem 1-Stunden-Wert < 135 mg/dl (n=10) jeweils nach mindestens 23 Schwangerschaftswochen. Auch in vorhergegangenen Schwangerschaften durfte bei den Kontrollen kein GDM vorgelegen haben.

3.1.3 Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien waren Alkohol- oder Drogenabusus, ein manifester Diabetes vor der Schwangerschaft und chronische Erkrankungen, die die regelmäßige Einnahme von Medikamenten erforderten. Des Weiteren wurden fünf Teilnehmerinnen ausgeschlossen aufgrund eines akuten respiratorischen Infekts (n=2), einer manifesten Hyperthyreose (n=1) zu Studienbeginn sowie der Entwicklung eines T1D im Verlauf der Studie (n=1). Hypothyreose (n=52), milde Hypertonie (n=4), gastroösophagealer Reflux (n=2) und Rivaroxaban-Prophylaxe nach Lungenembolie (n=1) waren keine Ausschlusskriterien.

Insgesamt standen Daten von 300 Probandinnen für die Analysen dieser Dissertation zur Verfügung.

3.2 Visitenablauf und Probengewinnung

Das Material zu den im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Messungen stammte vom Baseline-Visit, der 3 – 16 Monate nach der Entbindung stattfand.

3.2.1 Vorbereitung

Vor ihrem Besuch wurden die Probandinnen gebeten, sich mindestens 3 Tage lang normal zu ernähren und täglich ungefähr 150 g Kohlenhydrate aufzunehmen. Fasten und Low-Carb Diäten führten zur Verschiebung des Tests. Außerdem sollten sie am Vortag weder Alkohol konsumieren noch unübliche oder extreme sportliche Betätigungen ausüben.

Dauermedikamente sollten normal weitergenommen werden, Rauchen und Bedarfsmedikation waren vor und während des Tests nicht erwünscht. Vor dem Untersuchungstag musste eine mindestens 8-stündige Nahrungskarenz erfolgen und es durften keine Anzeichen eines akuten Infekts vorliegen.

3.2.2 Durchführung des oralen Glukosetoleranztests

Am Testtag wurde eine periphere Venenverweilkanüle gelegt (G 20, Vasofix Braunnüle, B. Braun Melsungen AG, Hessen, Deutschland), über die sämtliche Blutentnahmen erfolgten. Die Nüchternblutentnahme setzte sich aus den in Tabelle 3.1 genannten Bestandteilen zusammen.

Tabelle 3.1: Bestandteile der Blutentnahmen

Probenröhrchen	Verwendung	Messverfahren/Verarbeitung
Kapillare	Glukosemessung	Super GL mittels Biosensor
Serum	Antikörper T1D (IA2 und GAD)	ELISA
	Insulinmessung	Chemiluminescent immunoassay
EDTA	Differentialblutbild	Klinisches Labor
	HbA1c	Klinisches Labor
	Plasma Leptin	ELISA
	DNA	Kryokonservierung
	NEFA	Enzymatic calorimetric method
Na-Fluorid	Glucosemessung	Glucose HK Gen.3
Li-Heparin	Triglyceride	Enzymatic caloric test
	LDL-Cholesterin	Friedewald-Formel*
	HDL-Cholesterin	Enzymatic caloric test
	hsCRP	Klinisches Labor
	TSH, Kreatinin, GFR, GPT, GOT, γ -GT	Klinisches Labor
P800	Plasma	Kryokonservierung
PaxGene	RNA	Kryokonservierung

* Alle Werte der Triglyceride waren < 400 mg/dl.

Hersteller siehe Materialliste im Anhang (Tab. 10.1 und Tab. 10.2).

DNA: Desoxyribonukleinsäure; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; GAD: Glutamatdecarboxylase-Antikörper; GFR: Glomeruläre Filtrationsrate; γ -GT: Gamma-Glutamyl-Transferase; GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase; HbA1c: glykiertes Hämoglobin; HDL: High-density Lipoprotein; hsCRP: hochsensitives C-reaktives Protein; IA2: Tyrosinphosphatase-Antikörper; Li: Lithium; LDL: Low-density Lipoprotein; Na: Natrium; NEFA: Non esterified fatty acids; RNA: Ribonukleinsäure; T1D: Typ-1-Diabetes; TSH: Thyroidea stimulierendes Hormon

Es folgte ein standardisierter oGTT mit 75 g Glukose (Accu-Chek Dextrose O.G.-T. Saft 300 ml, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Weitere Blutentnahmen erfolgten nach 30, 60, 90 und 120 Minuten mit jeweils Bestimmungen von Insulin, Glukose und Plasmablutentnahme. Nach 120 Minuten wurde zusätzlich die Glukose im Schnellmessgerät Super GL überprüft.

3.2.3 Weitere Erhebungen

Während des oGTT wurde zweimal in sitzender Position der Blutdruck bestimmt und aus beiden Werten der Mittelwert gebildet (Omron M500 Oberarm Blutdruckmessgerät HE, Omron, Kyoto, Japan). Dazu erfolgte zunächst die Blutdruckmessung an beiden Armen. Nach mindestens 30 Minuten wurde die zweite Messung an dem Arm wiederholt, der initial den höheren Wert aufgewiesen hatte. Zur letzten Blutentnahme wurde mindestens ein 10-minütiger Abstand eingehalten und es wurde darauf geachtet, dass die Probandin die letzten 15 Minuten vor der Messung in sitzender Haltung verbracht hatte. Während der Messung wurde sie gebeten, nicht zu sprechen und eine entspannte Haltung einzunehmen. Der Ruhepuls wurde während der zweiten Messung ermittelt. Im Laufe des Tests wurde zudem eine Auskultation der Lunge und des Herzens vorgenommen.

Nach dem oGTT wurden Größe sowie Taillen- und Hüftumfang der Probandin auf einen Zentimeter genau ermittelt. Im Rahmen einer Bio-Impedanz-Analyse (Waage: Tanita BC-418, Tanita Corporation, Arlington Heights, IL; Auswertungssoftware: GMON) wurden Gewicht und Körperzusammensetzung bestimmt [83, 84].

Die Probandin hatte zudem die Möglichkeit, weitere Untersuchungen wahrzunehmen (Spirometrie, intravenöser Glukosetoleranztest oder Magnetresonanztomographie). Daten dieser Untersuchungen sind in diese Dissertation nicht eingeflossen.

3.3 PBMC-Verarbeitung

3.3.1 Isolierung

Ein 7,5 ml EDTA-Röhrchen der Nüchternblutentnahme wurde im Anschluss stehend bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von maximal 30 Stunden weiterverarbeitet.

Die Isolierung der PBMC aus dem EDTA-Blut erfolgte mittels Ficoll Hypaque Dichtegradientenzentrifugation [39]. Alle verwendeten Reagenzien befanden sich zum Zeitpunkt der Verarbeitung auf Raumtemperatur.

Nach der ersten Zentrifugation bei 491 g für 10 Minuten, wurden die Blutzellen in 30 ml Hanks' balanced salt solution (HBSS, calcium, magnesium, no phenol red, Gibco, Paisley, Schottland, UK) resuspendiert. Das HBSS enthielt zusätzlich 1 %

Antibiotika (Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml), Gibco, Paisley, Schottland, UK), 1 % L-Glutamine (200 mM, Gibco, Paisley, Schottland, UK) und 1 % HEPES buffer solution (1 M in H₂O, Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

Danach folgte das langsame Unterspritzen von 13 ml Ficoll-Lösung (Biocoll separating solution, Biochrom, Cambourne, Cambridge, UK). Durch die anschließende Zentrifugation für 30 Minuten ohne Beschleunigung und Bremse bei 491 g, erfolgte die dichteabhängige Auftrennung in drei Phasen. Die PBMC wurden aus der mittleren Phase (s. Abb. 1.1) aufgenommen. Nach drei Waschvorgängen für je 10 Minuten bei 491 g mit weiteren 45 ml HBSS, folgte die Zählung der PBMC mittels Trypanblau [85].

3.3.2 Kryokonservierung und Aufbewahrung

Die Zellen wurden anschließend rasch in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), das 10 % fetales Kälberserum (FCS, FBS Superior, Biochrom, Cambourne, Cambridge, UK) enthielt, gelöst und in zwei Kryoröhrchen zu je 1 ml eingefroren. Um intrazelluläres Gefrieren zu verhindern, das auftritt wenn die Kühlung der Zellen zu schnell stattfindet, wurden die Kryoröhrchen für 24 - 72 Stunden in einem Gefrierbehälter mit 100 % Isopropyl Alkohol bei -80°C gelagert [86]. Dadurch fand eine graduelle Herunterkühlung von ungefähr 1°C/min statt [86].

Danach wurden die PBMC zügig in die gasförmige Phase der Stickstofftanks (-196°C) überführt und bis zu 7 Jahre lang im Helmholtz Zentrum München gelagert. Zu Transportzwecken wurden die Proben zweimal aus dem Stickstoff in Trockeneis zwischengelagert und gelangten nach maximal 6 Stunden zurück in die Stickstofftanks.

3.3.3 Auftauen

Die PBMC wurden einen Tag vor den phänotypischen und funktionalen Analysen aufgetaut und inkubiert [87]. Der Auftauvorgang ging möglichst schnell vonstatten, um osmotische Veränderungen, die bei langsamem Auftauen auftreten können und potenziell toxische Effekte des DMSO zu vermeiden [86]. Auftauen bei 37°C führt zu einem Lebendzellanteil von durchschnittlich 95,1 % im Vergleich zu 69,7 % bei 4°C [88].

Das Medium (RPMI 1640 ohne L-Glut, Gibco, Paisley, Schottland, UK), das 1 % Antibiotika (Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml), Gibco, Paisley, Schottland,

UK), 1 % L-Glutamine (200 mM, Gibco, Paisley, Schottland, UK), 1 % HEPES buffer solution (1 M in H₂O, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) und 10 % FCS enthielt sowie die Reaktionsgefäße, wurden daher zunächst im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt [88].

Die PBMC wurden aus dem Stickstoff entnommen und in Trockeneis zwischengelagert. Die Kryoröhrchen wurden nach und nach zügig im Wasserbad aufgetaut, solange bis nur noch ein kleiner Eispfropf innerhalb des Röhrchens zu sehen war. Anschließend wurden die Kryoröhrchen desinfiziert und vorsichtig zu 10 ml des Mediums gegeben. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 491 g und Raumtemperatur für 10 Minuten und Waschen in je 10 ml des Mediums, wurden die PBMC auf eine Konzentration von 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Anschließend wurden sie über Nacht in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellpopulationen zu quantifizieren und ihre Eigenschaften zu analysieren. Es gibt fluoreszierende Antikörper, die spezifisch an Oberflächenproteine binden, beispielsweise an die Proteine der Cluster-of-differentiation (CD)-Klassifizierung. In Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshops wurde die Nomenklatur der mehr als 350 verschiedenen CD-Moleküle festgelegt [89]. Sie sind oft charakteristisch für spezifische Zelltypen und können deshalb als Marker für diese verwendet werden [89]. NK-Zellen werden so beispielsweise als CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ definiert [90, 91].

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen in einer Suspension einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und Emissionen sowie Streuungen durch Sensoren gemessen. Der Teil des Lichts, der durch die Zellen gestreut wird, kann in Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter (FSC)) und Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter (SSC)) unterschieden werden. FSC korreliert mit dem Volumen und der Größe der Zelle und SSC mit der Granularität, Größe und Struktur des Zellkerns. Durch die Kombination von FSC und SSC können somit bereits ungefärbt Zelltypen unterschieden werden. Beispielsweise sind Monozyten und Granulozyten durch hohes FSC und SSC charakterisiert, Thrombozyten und Erythrozyten dagegen durch niedriges FSC und SSC [92].

Fluoreszenzsignale der gebundenen Antikörper werden nach Anregung durch einen Laser emittiert und bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Es können

gleichzeitig verschiedene Antikörper untersucht werden, solange diese über unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe mit jeweils charakteristischen Emissionsspektren verfügen.

3.5 Anzahl und Aktivierung der NK-Zellen

Zur Phänotypisierung der NK-Zellen als $CD3^- CD16^+ CD56^+$ [90, 91] wurde BD Simultest CD3/CD16+CD56 verwendet, das aus FITC-labeled CD3 (SK7), PE-labeled CD16 (B73.1) und PE-labeled CD56 (MY31) bestand. Als genereller Leukozytenmarker wurde PerCP-labeled CD45 (2D1) verwendet [72, 93]. APC-labeled CD69 (FN50) diente als Marker für die Zellaktivierung [71, 73, 78]. Alle Antikörper stammten von Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ).

3.5.1 Titration und Isotypkontrolle der Antikörper

Die Titration der Antikörper führt nicht nur zu Kosteneinsparungen, sondern auch zu besseren Ergebnissen. Bei zu geringer Antikörperkonzentration sind Zellpopulationen schlecht abgrenzbar. Zu hohe Antikörperkonzentrationen können zu mehr unspezifischen Bindungen führen, die ebenfalls das Gaten erschweren [94].

Daher wurden die benötigten Antikörpermengen zunächst in einer Titrationsreihe bestimmt. Dazu wurden für jeden der Antikörper separat Testmessungen mit 4, 8, 12, 16 und 20 μ l durchgeführt.

Bei CD45 und CD3/CD16+CD56 waren die Zellpopulationen sehr gut abgrenzbar. CD69 war bei den NK-Zellen schwieriger abgrenzbar, da meistens nur wenige positive Zellen vorhanden waren. Daher wurde CD69 zunächst in allen $CD45^+$ Lymphozyten gated und das Gate anschließend auf die NK-Zellen übertragen. Zusätzlich wurden Kontrollmessungen mit der Isotypkontrolle CD69 durchgeführt. Die beiden ermittelten Werte für $CD69^+$ NK-Zellen stimmten annähernd überein, sodass in der gesamten Kohorte auf Isotypkontrollen verzichtet werden konnte. Die in Tabelle 3.2 dargestellten Werte wurden als optimale Antikörpermengen ermittelt und für alle weiteren Messungen verwendet.

Tabelle 3.2: *Durch Titration ermittelte AK-Mengen*

	AK-Menge [μ l]
CD45 PerCP	16
CD69 APC	20
CD3/CD16+CD56 FITC/PE	4
Isotypkontrolle CD69	20

Alle AK stammten von Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ).
Isotypkontrolle CD69 nicht für gesamte Kohorte notwendig. AK: Antikörper

3.5.2 Versuchsaufbau

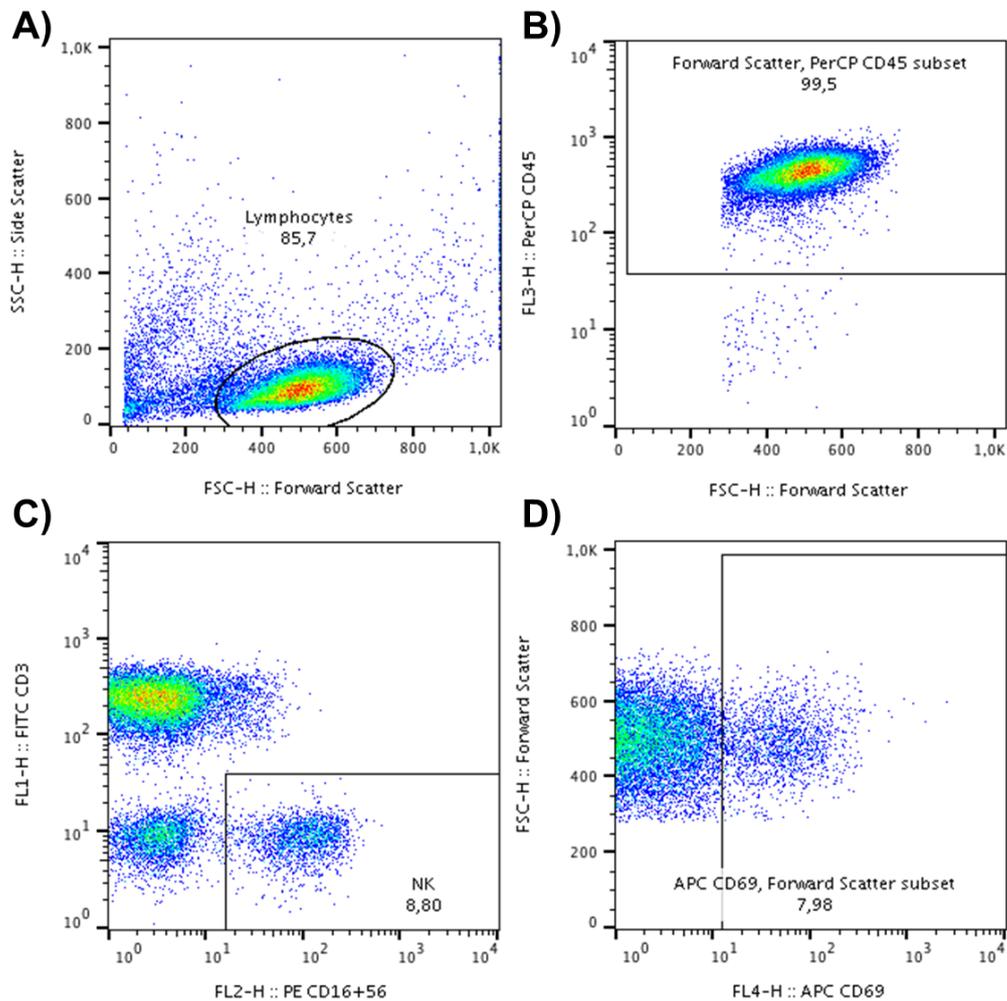
Die am Vortag aufgetauten PBMC wurden bei 491 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypanblau gezählt und die Viabilität bestimmt [85]. Sie wurden im RPMI-Medium resuspendiert bis zu einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml. Alle im folgenden verwendeten Reagenzien hatten eine Temperatur von 4°C und die Schritte, bei denen Antikörper verwendet wurden, erfolgten ohne direkte Lichteinstrahlung.

Die PBMC (je 250.000 Zellen bzw. 250 μ l) wurden zu 2 ml phosphate buffered saline (PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) gegeben. Das PBS enthielt zudem 1 % FCS, um unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden [95]. Es folgte eine Zentrifugation für 8 Minuten bei 491 g. Für die phänotypische Analyse wurde das Zellpellet wie in Tabelle 3.2 angegeben mit den Antikörpern vermischt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein Waschvorgang in 2 ml reinem PBS und die Fixierung mit je 50 μ l Fix/Perm Solution A (Caltag Medsystems Ltd, Buckingham, UK) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit 2 ml reinem PBS und abschließend die Resuspendierung in 200 μ l des PBS. Bis zur weiteren Verarbeitung innerhalb von maximal 12 Stunden, wurden die Proben bei 4°C dunkel gelagert.

Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden mit dem FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) gemessen und mithilfe der FlowJo Software (Version 10.5.3, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) ausgewertet. Das gesamte Gating wurde von zwei unabhängigen Beurteilern durchgeführt (Dr. Christina Gar und Julia Beck) und ein Mittelwert gebildet. Wenn dieser außerhalb der Limits of Agreement lag, wurde das Gating durch eine dritte Person evaluiert (Prof. Dr. Andreas Lechner).

3.5.3 Gatingstrategie

Um die Anzahl der NK-Zellen zu ermitteln, wurden zunächst die Lymphozyten gated. Mittels FSC und SSC wurde ein ovales Gate um die Lymphozyten gelegt (s. Abb. 3.1, A). Die Qualität dieses Lymphozytengates wurde mithilfe des CD45 validiert [72] und die Anzahl der CD45⁺ Lymphozyten bestimmt (s. Abb. 3.1, B). Die NK-Zellen waren definiert als CD3⁻ und CD56⁺ und/oder CD16⁺ und wurden als Anteil der CD45⁺ Lymphozyten angegeben (s. Abb. 3.1, C). Außerdem wurde der Anteil des Aktivierungsmarkers CD69 an allen NK-Zellen ermittelt. Dazu wurde CD69 zunächst in allen CD45⁺ Lymphozyten gated und anschließend das Gate auf die NK-Zellen übertragen (s. Abb. 3.1, D).



modifiziert nach Keilen et al., *Physiol Rep.* 2022

Abbildung 3.1: Gating: Anzahl und Aktivierung der NK-Zellen [96]

A: Gating der Lymphozyten mittels FSC und SSC

B: Validierung der Lymphozyten durch CD45

C: Gating der NK-Zellen als CD3⁺ sowie CD16⁺ und/oder CD56⁺

D: Bestimmung der CD69⁺ Lymphozyten (und Übertragung des Gates auf NK-Zellen)

FSC: Forward Scatter; NK: Natürliche Killer (-zellen); SSC: Sideward Scatter

3.6 Funktion der NK-Zellen

K562 ist eine humane Zelllinie, die von einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie stammt [97]. Da K562-Zellen kein MHC-I Molekül an ihrer Oberfläche exprimieren, bilden sie einen sensitiven Angriffspunkt für NK-Zellen und fungieren in Zytotoxizitätsassays häufig als deren Zielzellen [98–101].

Um die Funktion der NK-Zellen zu untersuchen, wurde das Reagenzienkit NK-TEST (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Dabei handelte es sich um einen Zytotoxizitätsassay, der kryokonservierte vorgefärbte K562-Tumorzellen als Targetzellen enthielt. Die K562 waren mit einem grünen, fluoreszierenden Farbstoff versehen.

3.6.1 Auftauen K562

Die K562 wurden am Versuchstag zügig in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach Desinfektion der Kryoröhrchen wurden diese zu 50 ml des ebenfalls auf 37°C vorgewärmten Herstellermediums (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) gegeben. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 120 g und Raumtemperatur wurden die K562 in 4 ml des Herstellermediums resuspendiert. Viabilität und Zellzahl wurden mit der Trypanblaumethode bestimmt [85]. Wenn die Viabilität unter 92 % lag, wurde eine Ficoll-Hypaque Auftrennung vorgenommen, um die toten Zellen zu entfernen [39]. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei 120 g und Raumtemperatur. Anschließend wurde die Zellkonzentration auf 10^5 Zellen/ml im Herstellermedium angepasst.

3.6.2 Versuchsaufbau

Die PBMC, die am Vortag aufgetaut worden waren, dienten als Effektorzellen (E). Sie wurden mit den K562 Targetzellen (T) in verschiedenen E:T Verhältnissen gemischt (s. Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: E:T Verhältnisse der PBMC (E) und K562 (T)

E:T	PBMC [μl]	K562 [μl]	Medium [μl]
2,5:1	7,5	50	142,5
5:1	15	50	135
10:1	30	50	120
25:1	75	50	75
50:1	150	50	-
100:1	300	50	-
200:1	600	50	-

E: Effektorzellen; K562: Tumorzelllinie; PBMC: Periphere mononukleäre Blutzellen; T: Targetzellen

Diese lagen je nach vorhandener Zellmenge zwischen 2,5:1 bis 200:1. Die Ansätze wurden mit der angegebenen Menge an Herstellermedium aufgefüllt.

Als Positivkontrolle für Zelllyse wurden in einem Ansatz 20 μl Saponin (Konzentration 0,3 mg/dl) zu den K562 zugegeben wie bei Piriou et al. beschrieben (s. Tab. 3.4) [102]. Um den Spontantod der PBMC und K562 zu evaluieren, wurden beide Zellreihen auch isoliert voneinander inkubiert. Dies diente gleichzeitig als Negativkontrolle (s. Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Positiv- und Negativkontrollen

	PBMC [μl]	K562 [μl]	Saponin [μl]
Negativkontrolle I	-	100	-
Negativkontrolle II	15*	-	-
Positivkontrolle	-	100	100

*mindestens

K562: Tumorzelllinie; PBMC: Periphere mononukleäre Blutzellen

Alle Probenansätze wurden mittels Vortex-Schüttler gemischt und anschließend bei 491 g für 3 Minuten zentrifugiert. Danach kamen sie für zwei Stunden in den Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Proben auf Trockeneis gestellt und innerhalb von einer Stunde weiterverarbeitet.

Im NKTEST Kit war eine rot fluoreszierende DNA-Färbelösung zur Detektion von toten Zellen enthalten. Vor Messbeginn wurden jedem Röhrchen 30 μl dieser Lösung zugegeben. Nach Vortex-Mischen und 5-minütiger Inkubation wurden die Proben innerhalb von 30 Minuten im FACSCalibur gemessen.

3.6.3 Gatingstrategie

Das Gating wurde wie vom Hersteller beschrieben in der Histogramm-Ansicht durchgeführt. Anhand der roten und grünen fluoreszierenden Farbstoffe konnte zwischen toten K562 (rot + grün), lebenden K562 (grün), toten PBMC (rot) und lebenden PBMC (farblos) unterschieden werden (s. Abb. 3.2).

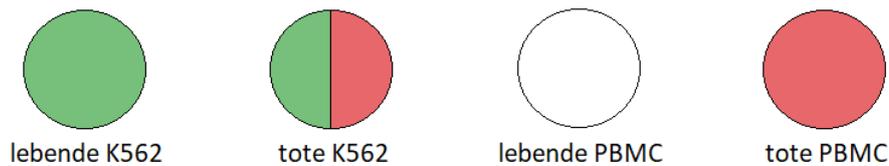


Abbildung 3.2: Unterscheidung tote und lebende K562 und PBMC

K562: Tumorzelllinie; PBMC: Periphere mononukleäre Blutzellen

Im ersten Schritt wurde der Anteil grün gefärbter Tumorzellen in der K562-Negativkontrolle ermittelt. Das Gate wurde für jeden Messtag bestimmt und für alle Proben dieses Tages übernommen. Es wurde sichergestellt, dass weniger als 1,5 % der PBMC in diesem Gate enthalten waren. Mithilfe des roten Farbstoffes wurde der Anteil der toten Zellen in oben genannter Negativkontrolle für den jeweiligen Tag bestimmt und das Gate auf alle Proben übertragen. Anschließend konnte der Prozentteil toter K562 an allen K562 in den verschiedenen E:T Ratios ermittelt werden. Mit einem gesonderten Gate wurden der Spontantod der PBMC sowie der Anteil toter K562 in der Positivkontrolle gemessen.

3.7 Berechnungen

Mithilfe der Werte des oGTT wurde der Insulin-Sensitivitäts-Index (ISI) berechnet, wie von Matsuda und DeFronzo beschrieben [103].

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{MAD} = \frac{2\text{Dia} + \text{Sys}}{3}$$

mit *Dia* für den diastolischen und *Sys* für den systolischen Wert.

Der Body Mass Index (BMI) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpermasse}[kg]}{\text{Körpergröße}[m]^2}$$

Zur Bestimmung der absoluten Zahl der NK-Zellen NK_{abs} wurde die Prozentzahl der relativen NK-Zellen NK_{rel} mit der Menge der Lymphozyten pro μl aus dem Differentialblutbild Lymph_{abs} multipliziert:

$$\text{NK}_{abs} = \text{NK}_{rel} \cdot \text{Lymph}_{abs}$$

Um etwaige Pipettierabweichungen zu berücksichtigen, wurden die exakten E:T Verhältnisse für jede Probe berechnet. Dazu wurden für jeden Versuchstag zunächst die K562 isoliert betrachtet (Negativkontrolle) und der Anteil der tatsächlich grün gefärbten K562 ermittelt (K562_{gesamt} , durchschnittlich ca. 80 %). Auch in den Versuchsansätzen mit verschiedenen E:T Verhältnissen wurde jeweils der Anteil der K562 bestimmt (K562_{Probe}).

Durch folgende Gleichung konnten dann die tatsächlichen E:T Verhältnisse für jede Probe berechnet werden:

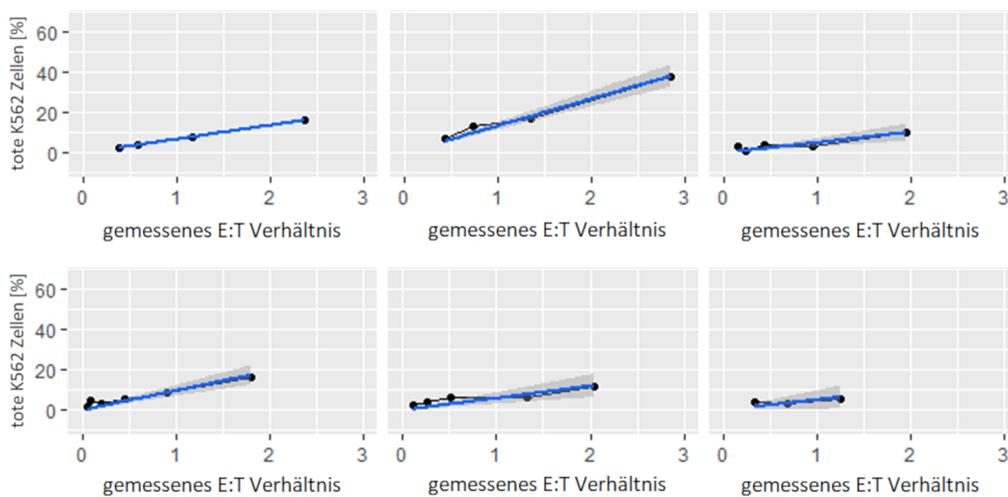
$$\text{Verhältnis}_{E:T} = \frac{\text{K562}_{gesamt}}{\text{K562}_{Probe}}$$

Zusammen mit NK_{rel} wurde dann das Verhältnis von NK-Zellen zu K562 in den Proben bestimmt:

$$\text{Verhältnis}_{E_{NK}:T} = \text{NK}_{rel} \cdot \text{Verhältnis}_{E:T}$$

Um die effektive Anzahl an getöteten K562 zu erhalten, wurde der Spontanod der K562 (bestimmt aus der Negativkontrolle des jeweiligen Tages) von den Proben subtrahiert.

Zur Evaluation der NK-Zell-Funktion, respektive der Zytotoxizität, wurde in einem Koordinatensystem das Verhältnis $E_{NK}:T$ gegen die effektive Anzahl an getöteten K562 für alle E:T Verhältnisse aufgetragen. Das Ergebnis war ein Graph für jede Studienteilnehmerin, dessen Steigung die Funktion der NK-Zellen repräsentierte (s. Abb. 3.3).



modifiziert nach Keilen et al., Physiol Rep. 2022

Abbildung 3.3: Ermittlung der Steigung als Maß für die Zytotoxizität

Schwarze Punkte: Anteil der getöteten K562 bei dem gemessenen Effektor:Target (E:T) Verhältnis; blaue Linie: bestimmte Steigung; graue Schattierung: 95 % Konfidenzintervall (KI) der Steigung [96]

3.8 Statistische Analysen

Alle metrischen und normal verteilten Variablen wurden als Durchschnitt \pm Standardabweichung angegeben; nicht-normal verteilte Variablen wurden als Median (erstes Quartil bis drittes Quartil) präsentiert. Um die Gruppen zu vergleichen, wurden der Mann-Whitney-U Test und der Kruskal-Wallis Test verwendet. Für die Korrelationsanalysen wurden Spearman Korrelationskoeffizienten ρ berechnet. P-Werte $< 0,05$ galten als statistisch signifikant.

Alle statistischen Berechnungen wurden mithilfe des Statistikprogramms SAS (Version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Abbildungen des Gatings wurden mittels Microsoft PowerPoint (Version 2101), der FlowJo Software (Version 10.5.3; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) und R (Version 3.1.3, R Development Core Team) angefertigt.

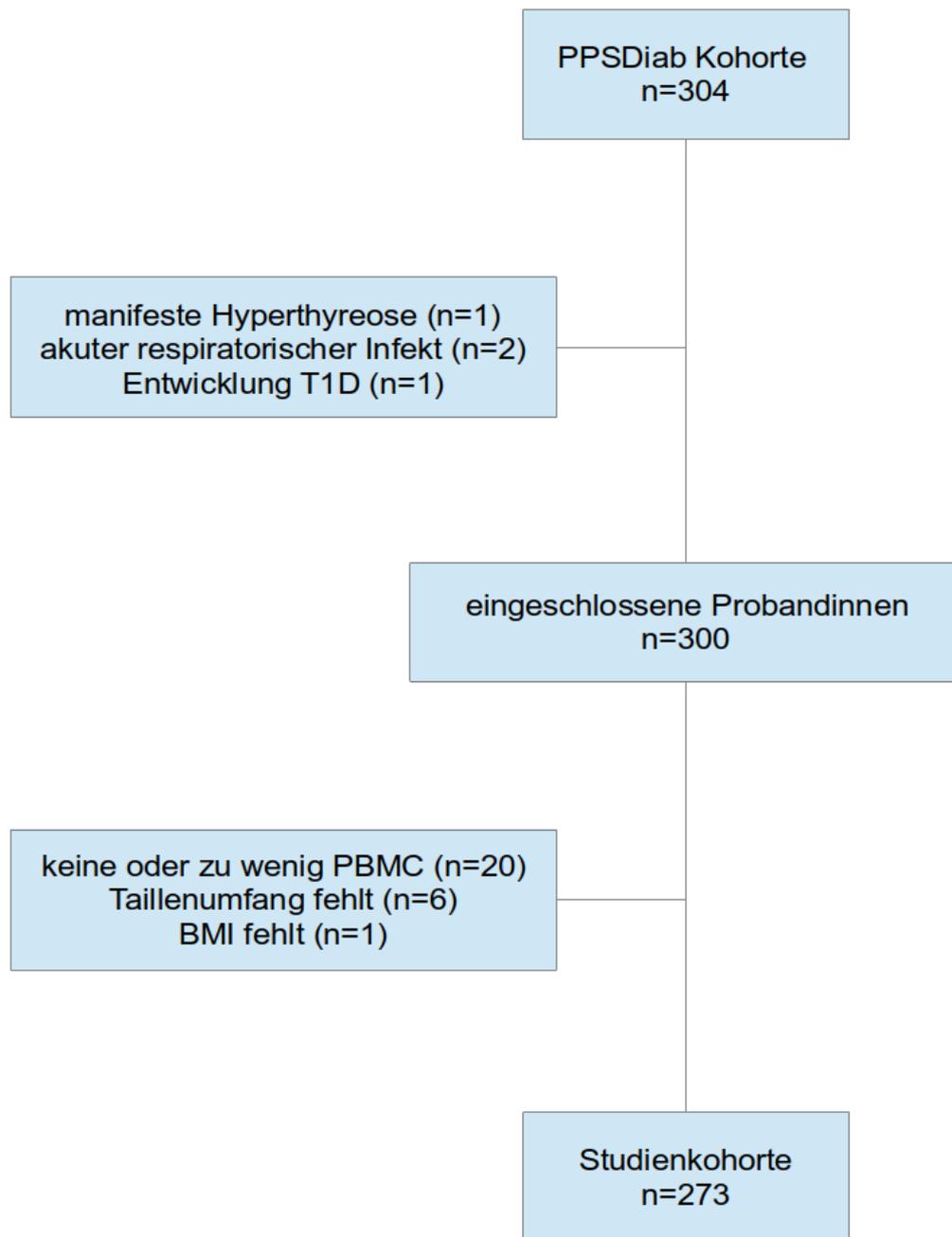
4 Ergebnisse

4.1 Studienkohorte

Von den zu Studienbeginn eingeschlossenen Probandinnen (n=300) waren von 20 keine PBMC vorhanden oder es konnten nicht genügend isoliert werden. 6 Probandinnen wiesen fehlende Werte für den Taillenumfang auf und bei einer konnte der BMI nicht ermittelt werden. Somit standen insgesamt 273 Proben zur Messung der NK-Zell-Charakteristika zur Verfügung (s. Abb. 4.1).

Da bei 7 Frauen die Lymphozytenzahl aus dem Differentialblutbild fehlte, war die Berechnung der absoluten NK-Zahl nur bei 266 Probandinnen möglich. Außerdem war bei 15 Proben die Zahl der isolierten NK-Zellen zu gering, um den Funktionsassay durchführen zu können. Somit konnte dieser bei 258 Probandinnen ausgewertet werden.

Von den Probandinnen der Studienkohorte hatten 64,5 % einen GDM in der Vorgeschichte und 27,5 % wiesen prädiabetische Glukosewerte auf (s. Tab. 4.1).



modifiziert nach Keilen et al., Physiol Rep. 2022

Abbildung 4.1: Flussdiagramm der Studienkohorte [96]

T1D: Typ-1-Diabetes; PBMC: Periphere mononukleäre Blutzellen

Tabelle 4.1: Baseline-Charakteristika der Studienkohorte (n=273) [96]

	Verteilung	Spannweite
Alter (Jahre)	35,5 ± 4,3	20 – 49
BMI (kg/m ²)	25,4 ± 5,9	17,5 – 49,9
Taillenumfang (cm)	81,3 ± 11,4	63 – 120
Körperfett (%)	32,2 ± 8,0	12,5 – 53,5
Systolischer Blutdruck (mmHg)	117,6 ± 11,7	94 – 156
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	73,8 ± 9,2	50 – 107
Triglyceride (mg/dl)	67 (53 – 92)	27 – 313
HDL-Cholesterin (mg/dl)	62 (54 – 72)	32 – 127
LDL-Cholesterin (mg/dl)	104 (86 – 121)	32 – 214
NEFA (mol/l)	591 (467 – 742)	51 – 1415
Leptin (ng/ml)	10,6 (5,6 – 16,2)	0,7 – 78,3
hsCRP	0,05 (0,01–0,17)	0 – 2,1
Nüchtern-PG (mg/dl)	92,8 ± 9,2	65 – 136
2h-PG (mg/dl)	113,2 ± 31,8	53 – 241
ISI	5,2 (3,4 – 7,5)	0,8 – 18,2
GDM in der Vorgeschichte (n [%])	176 (64,5)	-
Prädiabetes (n [%])	75 (27,5)	-
Leukozyten (10 ⁹ /l)	5,6 (4,8 – 6,6)	2,6 – 11,6
Lymphozyten (%)	34 (28 – 38)	13 – 57
NK-Zellen relativ (% Lymphozyten)	4,8 (2,5 – 9,1)	0,2 – 41,3
NK-Zellen absolut (10 ⁶ /l)	86,8 (45,4 – 165,4)	45 – 8997,4
CD69 ⁺ (% NK-Zellen)	29,2 (13,1 – 45,4)	1,5 – 82,5
NK-Zell-Funktion (Zytotoxizität, %)	10,6 (7,0 – 14,4)	1,8– 94,4

Die Verteilung wird als Mittelwert angegeben ± SD, Median (Q1–Q3) oder Häufigkeit (%; mittlere Spalte). Die Spannweite wird als Minimum-Maximum Wert angegeben (rechte Spalte). Fehlende Werte: Körperfett: n = 2; ISI: n = 1; Leukozyten: n = 1; Lymphozyten: n = 7; NK-Zellen absolut: n = 7; NK-Zell-Funktion: n = 15.

BMI: Body Mass Index; CD69⁺: positiv für Cluster of differentiation 69; GDM: Gestationsdiabetes; HDL: High-density Lipoprotein; hsCRP: hochsensitives C-reaktives Protein; ISI: Insulin-Sensitivitäts-Index; LDL: Low-density Lipoprotein; NEFA: nonesterified fatty acids; NK-Zellen: Natürliche Killerzellen; PG: Plasmaglukose

4.2 NK-Zellen und GDM

Da ein GDM in der Vergangenheit einen Risikofaktor zur Entwicklung eines T2D darstellt [29, 30], wurde die gesamte Studienkohorte zunächst unter diesem Gesichtspunkt in zwei Gruppen unterteilt. Insgesamt standen Proben von 97 normoglykämischen (niedriges Risiko) und 176 GDM-Schwangerschaften (hohes Risiko) zur Verfügung.

Tabelle 4.2 zeigt die Baseline-Charakteristika der beiden Gruppen im Vergleich. Frauen nach einem GDM hatten einen höheren Taillenumfang, einen höheren BMI und höhere Werte für Blutdruck und hsCRP als die Kontrollen. Außerdem wiesen sie ein schlechteres Lipidprofil auf (höhere Triglyceride, niedrigeres HDL-Cholesterin). In der GDM-Gruppe waren die Werte für NPG und 2-h PG signifikant höher bei gleichzeitig niedrigerem ISI.

Bezogen auf die NK-Zell-Charakteristika konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkannt werden. Die absolute Leukozytenzahl war etwas höher in der GDM-Gruppe als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 4.2: Baseline-Charakteristika von Frauen mit (hohes Risiko) und ohne (niedriges Risiko) GDM in der Vergangenheit

	Hohes Risiko (n = 176)	Niedriges Risiko (n = 97)	p-Wert
Alter (Jahre)	35,6 ± 4,5	35,3 ± 4,2	0,657
BMI (kg/m ²)	26,1 ± 6,3	24,1 ± 4,7	0,015
Taillenumfang (cm)	82,8 ± 12,0	78,5 ± 9,6	0,008
Systolischer Blutdruck (mmHg)	119,3 ± 11,3	114,6 ± 11,7	<0,001
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	74,8 ± 8,7	71,9 ± 9,8	0,003
Triglyceride (mg/dl)	70,0 (55,0 - 98,0)	61,0 (52,0 - 78,0)	0,019
HDL-Cholesterin (mg/dl)	61,0 (51,0 - 69,0)	64,0 (56,0 - 73,0)	0,033
hsCRP	0,07 (0,02 - 0,26)	0,04 (0,01 - 0,08)	0,005
NPG (mg/dl)	94,0 (89,0 - 100,0)	90,0 (84,0 - 93,0)	<0,001
2-h PG (mg/dl)	118,0 (100,0 - 138,0)	94,0 (82,0 - 108,0)	<0,001
ISI	4,5 (2,9 - 6,7)	6,7 (5,0 - 8,5)	<0,001
IR30	46,5 (33,2 - 75,9)	41,1 (31,5 - 59,6)	0,098
Leukozyten [10 ⁹ /l]	5,9 (4,9 - 6,9)	5,5 (4,7 - 6,2)	0,013
Lymphozyten [%]	33,0 (28,0 - 38,0)	34,0 (29,5 - 38,0)	0,210
NK-Zellen relativ (% Lymphozyten)	4,8 (2,5 - 9,2)	4,6 (2,2 - 8,4)	0,428
NK-Zellen absolut (10 ⁶ /l)	99,4 (47,5 - 189,1)	81,2 (40,8 - 148,5)	0,149
CD69 ⁺ (% NK-Zellen)	31,0 (13,1 - 47,3)	26,3 (13,9 - 42,1)	0,289
NK-Zell-Funktion (Zytotoxizität, %)	11,0 (7,2 - 14,5)	10,2 (6,9 - 14,0)	0,296

Gruppenvergleich mit Mann-Whitney-U Test. Werte angegeben als Durchschnitt ± SD oder Median (Quartil 1 bis 3).

Signifikante Unterschiede sind **fett** markiert. Fehlende Werte: ISI: n = 1; IR30: n = 1; Leukozyten: n = 1; Lymphozyten: n = 7; NK-Zellen absolut: n = 7; NK-Zell-Funktion: n = 15;

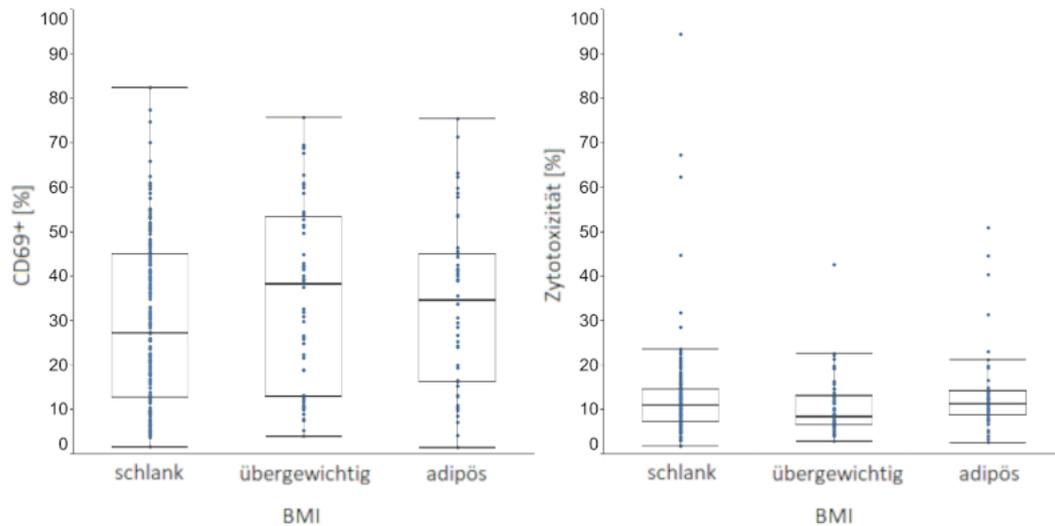
BMI: Body Mass Index; CD69⁺: positiv für Cluster of differentiation 69; HDL: High Density Lipoprotein; hsCRP: hochsensitives C-reaktives Protein; IR30: Insulinabgabe nach 30 Minuten; ISI: Insulinsensitivitätsindex; NK-Zellen: Natürliche Killerzellen;

NPG: Nüchternplasmaglukose; PG: Plasmaglukose

4.3 NK-Zellen und Übergewicht/Adipositas

Als nächstes wurde ein Zusammenhang zwischen Übergewicht, Adipositas und NK-Zellen untersucht, wie er bereits in mehreren Studien berichtet wurde [71–74, 76–79]. Die Studienkohorte wurde basierend auf ihrem BMI in drei Gruppen eingeteilt (s. Tab. 4.3). Übergewicht war definiert als $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ und Adipositas als $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der relativen und absoluten NK-Zahl sowie in der NK-Zell-Funktion und dem Anteil der CD69^+ NK-Zellen gefunden werden (s. Abb. 4.2 und Tab. 4.3).



modifiziert nach Keilen et al., Physiol Rep. 2022

Abbildung 4.2: Gruppenvergleich CD69^+ NK-Zellen (links) und NK-Zell-Funktion (Zytotoxizität, rechts) zwischen den BMI-Kategorien [96]

Keine signifikanten Unterschiede (Kruskal–Wallis Test $p > 0,05$)

Tabelle 4.3: Gruppenvergleich der NK-Zell-Charakteristika zwischen schlanken, übergewichtigen und adipösen Frauen [96]

	Schlank n = 165	Übergewichtig n = 61	Adipös n = 47	p-Wert
BMI (Durchschnitt \pm SD)	21,8 kg/m ² \pm 1,7 kg/m ²	26,6 kg/m ² \pm 1,3 kg/m ²	36,1 kg/m ² \pm 5,0 kg/m ²	
Spannweite (Min - Max)	17,47 – 24,94 kg/m ²	25,04 – 29,97 kg/m ²	30,0 – 49,87 kg/m ²	
NK-Zellen rel. (% Lymphozyten)	5,1 (2,6 – 9,4)	4,8 (2,9 – 8,4)	3,8 (1,7 – 7,8)	0,187
NK-Zellen abs. (10 ⁶ /l)	86,9 (44,6 – 188,8)	92,6 (52,5 – 154,6)	85,9 (44 – 153,8)	0,632
CD69 ⁺ (% NK-Zellen)	27,2 (12,9 – 44,3)	37,6 (13,2 – 52,8)	33,6 (16,3–45)	0,136
NK-Zell-Funktion (%)	11,0 (7,1 – 14,5)	8,5 (6,4 – 13,2)	11,3 (8,7 – 14,2)	0,094

Gruppenvergleich mittels Kruskal–Wallis Test. Werte sind angegeben als Median (Q1–Q3).

Fehlende Werte: NK-Zellen absolut: n = 7; NK-Zell-Funktion: n = 15.

CD69⁺: positiv für Cluster of differentiation 69; NK-Zellen: Natürliche Killerzellen

Tabelle 4.4: NK-Zell-Charakteristika bei Frauen mit verschiedenen Schweregraden des Metabolischen Syndroms [96]

	0 n = 146	1 n = 82	2 n = 25	≥ 3 n = 20	p-Wert
NK-Zellen rel. (% Lymphozyten)	4,8 (2,4 – 8,7)	5,4 (3,1 – 10,0)	4,8 (2,3 – 7,7)	3,5 (1,4 – 8,4)	0,277
NK-Zellen abs. (10 ⁶ /l)	84,4 (44,1 – 140,9)	112,1 (46,1 – 196,2)	83,5 (46,6 – 154,3)	86,4 (23,7 – 195,8)	0,971
CD69 ⁺ (% NK-Zellen)	30,3 (14,8 – 47,3)	26,4 (12,2 – 44,4)	29,5 (13,1 – 42,7)	33,1 (15,8 – 43,2)	0,495
NK-Zell-Funktion (%)	10,4 (6,9 – 14,7)	10,4 (7,0 – 13,2)	10,1 (7,0 – 13,7)	12,5 (8,9 – 14,5)	0,267

Gruppenvergleich mittels Kruskal–Wallis Test. Werte sind angegeben als Median (Q1–Q3).

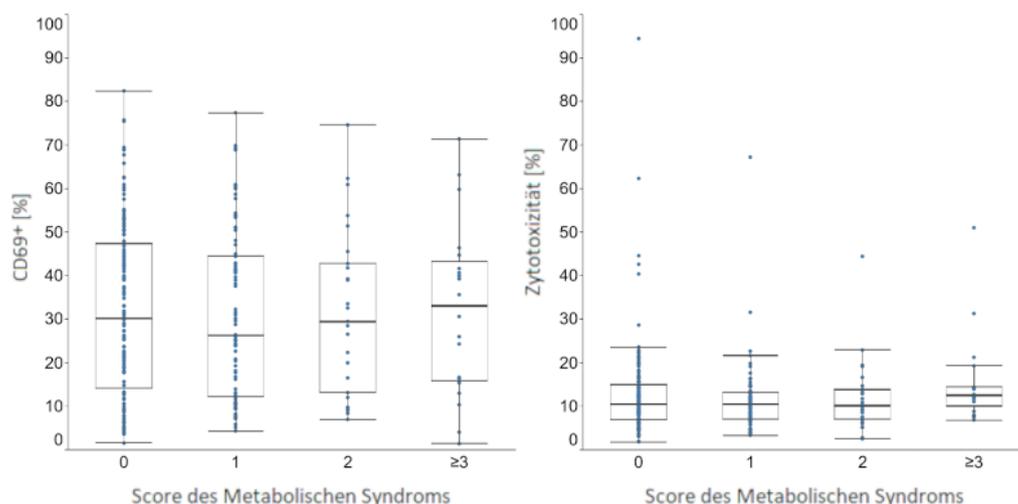
Fehlende Werte: NK-Zellen absolut: n = 7; NK-Zell-Funktion: n = 15.

CD69⁺: positiv für Cluster of differentiation 69; NK-Zellen: Natürliche Killerzellen

4.4 NK-Zellen und MetS

Um die nächste Frage nach einem Zusammenhang zwischen NK-Zellen und dem MetS zu beantworten, wurden die Studienteilnehmerinnen in vier verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung basierte auf den NCEP ATPIII Kriterien (s. Tab. 1.3). Da die Anzahl der Frauen mit vier ($n=4$) oder fünf zutreffenden Score-Punkten ($n=1$) zu klein war, um eine eigene Gruppe zu bilden, wurden die Gruppen wie folgt definiert: 0, 1, 2 oder ≥ 3 Komponenten des MetS.

Weder die relative und absolute Anzahl an NK-Zellen, noch die Zytotoxizität oder der Anteil aktivierter $CD69^+$ NK-Zellen unterschied sich signifikant zwischen den Gruppen (s. Abb. 4.3 und Tab. 4.4).



modifiziert nach Keilen et al., *Physiol Rep.* 2022

Abbildung 4.3: Gruppenvergleich $CD69^+$ NK-Zellen (links) und NK-Zell-Funktion (Zytotoxizität, rechts) zwischen den verschiedenen Schweregraden des Metabolischen Syndroms [96]

Keine signifikanten Unterschiede (Kruskal–Wallis Test $p > 0,05$). Wegen kleiner Gruppengrößen für Score 4 und 5, wurden Frauen mit einem Score ≥ 3 in einer Gruppe analysiert.

Korrelationsanalyse Zuletzt folgte eine Korrelationsanalyse der NK-Zell-Charakteristika mit den einzelnen Komponenten des MetS und damit assoziierten Laborwerten sowie anthropometrischen Werten (s. Tab. 4.5). Hierbei fiel eine Korrelation des HDL-Cholesterins mit der Anzahl der relativen und absoluten NK-Zellen auf. Außerdem korrelierte der Anteil der CD69⁺ NK-Zellen mit den Triglyceriden, dem Körperfett und Leptin. Die NK-Zell-Zytotoxizität zeigte Korrelationen mit nonesterified fatty acids (NEFA) und der 2h-PG. NEFA korrelierte zudem mit den absoluten NK-Zellen.

Alle Korrelationen waren positiv, jedoch blieb nur die Assoziation von HDL-Cholesterin und der relativen NK-Zahl signifikant, nachdem eine Korrektur für multiples Testen durchgeführt wurde.

Tabelle 4.5: Korrelationsanalyse der NK-Zellen mit verschiedenen Charakteristika des Metabolischen Syndroms (n = 273)

	NK-Zellen relativ (% Lymphozyten)		NK-Zellen absolut (10 ⁶ /l)		CD69 ⁺ (% NK-Zellen)		NK-Zell-Funktion (Zytotoxizität, %)	
	ρ	p-Wert	ρ	p-Wert	ρ	p-Wert	ρ	p-Wert
Alter	-0,002	0,976	-0,040	0,519	0,019	0,754	-0,005	0,936
BMI	-0,085	0,163	-0,016	0,801	0,101	0,095	-0,039	0,538
Taillenumfang	-0,063	0,296	0,002	0,977	0,041	0,503	0,014	0,817
Körperfett	-0,104	0,087	-0,042	0,498	0,142	0,019	-0,025	0,695
Systolischer Blutdruck	-0,046	0,450	-0,031	0,617	0,054	0,373	0,028	0,660
Diastolischer Blutdruck	0,022	0,716	0,025	0,688	0,051	0,403	0,034	0,589
Triglyceride	-0,074	0,225	-0,014	0,823	0,128	0,034	0,043	0,495
HDL-Cholesterin	0,211	<0,001	0,138	0,024	-0,032	0,594	-0,007	0,906
LDL-Cholesterin	-0,010	0,872	0,027	0,658	0,077	0,206	0,025	0,684
NEFA	0,105	0,083	0,124	0,043	-0,041	0,502	0,187	0,003
Leptin	-0,059	0,332	0,004	0,949	0,136	0,025	-0,022	0,727
hsCRP	-0,066	0,279	-0,011	0,856	0,104	0,088	0,029	0,641
NPG	0,039	0,518	0,047	0,446	-0,005	0,932	0,107	0,088
2h-PG	-0,051	0,399	0,006	0,925	-0,072	0,235	0,182	0,003
ISI	0,062	0,305	-0,003	0,958	-0,044	0,465	-0,062	0,322

Werte werden angegeben als Spearman Korrelationskoeffizienten. Korrelationen mit explorativer Signifikanz ($p < 0,05$) sind **fett** markiert. Fehlende Werte: ISI: n = 1; NK-Zellen absolut: n = 7; NK-Zell-Funktion: n = 15; Körperfett n = 2.

BMI: Body Mass Index; HDL: High Density Lipoprotein; hsCRP: hochsensitives C-reaktives Protein; ISI: Insulinsensitivitätsindex; NEFA: nonesterified fatty acids; NK-Zellen: Natürliche Killerzellen; NPG: Nüchternplasmaglukose; PG: Plasmaglukose [96]

5 Diskussion

5.1 NK-Zellen bei Frauen nach GDM

Frauen mit oder ohne GDM in der Vergangenheit zeigten keine Unterschiede bezogen auf die NK-Zell-Charakteristika, obwohl Frauen nach GDM ein erhöhtes Risiko haben, im Verlauf an T2D zu erkranken [29, 30]. Darauf deuteten in unseren Auswertungen auch die signifikant höheren Werte für NPG und 2h-PG im Vergleich zur Kontrollgruppe hin, auch wenn diese im Durchschnitt noch kein prädiabetisches Level erreichten (s. Tab. 4.2).

In einer Studie von Kim et al. wurde die NK-Zell-Funktion von Versuchspersonen mit Diabetes, Prädiabetes und gesunden Kontrollen verglichen [65]. Diese Studie ist unserer Arbeit am besten vergleichbar. Die NK-Zell-Funktion, gemessen anhand der IFN- γ Sekretion, war in dieser Studie vermindert in der Diabetes-, aber nicht in der Prädiabetesgruppe [65]. Außerdem korrelierte nur bei Diabetikern die NK-Zell-Funktion negativ mit dem HbA1c sowie der NPG und 2h-PG [65]. Die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass sich die NK-Zell-Funktion erst ab einem bestimmten Level der Hyperglykämie beginnt zu verschlechtern und dass dieses über dem des Prädiabetes liegen müsse [65]. Die Veränderungen der NK-Zell-Funktion wären danach Folge, und nicht etwa Ursache der Stoffwechselstörung.

In mehreren Studien mit übergewichtigen und normalgewichtigen Schwangeren, die aktuell an GDM erkrankt waren, konnten keine Unterschiede in der Gesamtzahl der relativen NK-Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gefunden werden [104–106]. Bei der Betrachtung von verschiedenen NK-Zell-Subtypen wurden jedoch signifikante Unterschiede festgestellt [104–107].

Untersuchungen zu NK-Zellen bei Frauen nach GDM wurden bisher nicht publiziert. In den in dieser Dissertation überprüften NK-Zell-Charakteristika konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden im Vergleich zu Frauen oh-

ne GDM in der Vorgeschichte. Möglicherweise ist der Zeitpunkt in der Pathogenese des T2D in dieser Kohorte noch zu früh, um Veränderungen der NK-Zellen aufzuweisen oder es müssten Subgruppen von NK-Zellen betrachtet werden. Diese könnten sein: die Subtypen CD56^{dim}CD16⁺ und CD56^{bright}CD16⁻ sowie die Expression der Oberflächenmarker CD27 and CD11b [108].

5.2 NK-Zellen bei Übergewicht und MetS

Basierend auf bisherigen Studien wurden eine reduzierte NK-Zahl sowie schlechtere Zytotoxizität mit höherem Aktivierungsgrad bei Personen mit Übergewicht und/oder MetS antizipiert [71–79].

Wir konnten jedoch keine Veränderungen in den genannten NK-Zell-Charakteristika bei Probandinnen mit Übergewicht oder verschiedenen Ausprägungsgraden des MetS finden. Es traten zwar Korrelationen zu metabolischen Komponenten auf, diese waren aber nur schwach und teils nicht schlüssig im physiologischen Kontext.

5.2.1 Literaturvergleich - Anzahl und Aktivierung

In unserer Studienkohorte lagen keine Veränderungen in der Anzahl der NK-Zellen bei Übergewicht oder MetS vor. Auch eine vermehrte Aktivierung in Form von CD69⁺ NK-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Es bestanden zwar Trends zu niedrigeren relativen NK-Zellen und mehr CD69⁺ NK-Zellen mit steigendem BMI, diese Werte erreichten jedoch keine Signifikanz.

Da die Durchflusszytometrie als ein verlässliches Messinstrument zur Bestimmung der NK-Zahl und CD69⁺ NK-Zellen gilt, ist es unwahrscheinlich, dass die Unterschiede zu anderen Studien aufgrund der Messtechnik zustande gekommen sind [109].

In einer Studie zu den Effekten von Langzeit-Kryokonservierung auf PBMC war die Zahl der NK-Zellen in kryokonservierten PBMC zwar niedriger als in frisch isolierten PBMC, diese Zahl blieb jedoch unabhängig von der Dauer der Lagerung stabil [110]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Kryokonservierungszeit zwischen 2 und 11 Jahren nur geringfügige Effekte auf die Qualität der PBMC hatte [111]. Die von uns durchgeführte Kryokonservierung sollte also ebenfalls nicht zu Unterschieden im Vergleich zu früheren Studien geführt haben.

Wir vermuten, dass die Unterschiede zu bisherigen Studien über NK-Zellen im Zusammenhang mit Übergewicht am ehesten auf die Struktur der jeweiligen Studienkohorten zurückzuführen sind. In früheren Studien wurden Unterschiede größtenteils in Individuen mit schwerer Adipositas gesehen mit einem durchschnittlichen BMI zwischen 40 kg/m^2 und über 50 kg/m^2 [71, 72, 77–79]. Studien hatten oft niedrige Fallzahlen mit Gruppengrößen von 14 oder weniger [77, 78, 112, 113] oder die Probandinnen und Probanden wurden drastischen Interventionen unterzogen wie beispielsweise bariatrischer Chirurgie [77, 114, 115]. In der vorliegenden Dissertation lag bei 47 Teilnehmerinnen der adipösen Gruppe der BMI bei durchschnittlich $36,1 \text{ kg/m}^2$ und somit niedriger als in oben genannten Studien. Bei Personen mit $\text{BMI} < 40 \text{ kg/m}^2$ konnten auch in anderen Studien keine signifikanten Unterschiede der NK-Zahl gefunden werden [112, 113]. Somit treten Unterschiede möglicherweise erst bei hochgradiger Adipositas zu Tage.

Unterscheiden muss man außerdem zwischen relativer und absoluter NK-Zahl. In den meisten Studien wurden die NK-Zahlen als relativer Anteil der Lymphozyten angegeben. Da ein höherer BMI zu einer Steigerung der Gesamtzahl der Lymphozyten führt [74, 109], könnte es sein, dass die relative NK-Zahl zwar sinkt, es aber bei der absoluten NK-Zahl nicht zwangsläufig zu Unterschieden kommen muss. In dieser Dissertation sah man ebenfalls eine nicht signifikante Tendenz zu niedrigeren relativen NK-Zahlen bei höherem BMI, diese konnte bei den absoluten NK-Zahlen jedoch nicht mehr beobachtet werden.

Korrelationsanalyse Unter den beobachteten Korrelationen zwischen den NK-Zell-Parametern und den metabolischen Komponenten, erschienen die zwischen NK-Zell-Aktivierung mit Körperfett, Triglyceriden und Leptin am ehesten im Einklang mit früheren Arbeiten. Viel et al. fanden beispielsweise mehr CD69⁺ NK-Zellen in adipösen verglichen mit normalgewichtigen Individuen [78]. Sie legten eine chronische Überstimulation von NK-Zellen im Kontext einer metabolischen Inflammation als möglichen Mechanismus nahe [78]. In dieser Dissertation waren die Korrelationen von NK-Zell-Aktivierung und den Charakteristika des MetS jedoch deutlich schwächer ausgeprägt.

Andere Korrelationen waren ebenfalls nur gering apparent und nicht schlüssig im physiologischen Kontext. Beispielsweise korrelierte die relative NK-Zahl sowohl positiv mit HDL-Cholesterin, einem Indikator für metabolische Gesundheit, als auch mit NEFA, die in Verbindung mit Übergewicht, Insulinresistenz und dem MetS stehen [116–118]. Nach der Korrektur für multiples Testen blieb nur die Korrelation zwischen HDL und der relativen NK-Zahl signifikant. Literatur

zu möglichen Interaktionen zwischen NK-Zellen und HDL ist spärlich. Es gibt Hinweise darauf, dass HDL die Aktivität von Lymphozyten beeinflussen könnte [119].

5.2.2 Literaturvergleich - Funktion

Bezogen auf die Zytotoxizität von NK-Zellen ist die Studienlage noch komplexer. Zytotoxizitäts-Assays, die mittels Durchflusszytometrie gemessen werden, sind zwar eine Standardmethode, diese werden jedoch häufig unterschiedlich ausgeführt bzw. ausgewertet. Einerseits wurden in früheren Studien nur einzelne E:T Verhältnisse betrachtet [64, 73, 78, 80], andererseits wurden tatsächliche E:T Verhältnisse nicht überprüft, sondern es wurde sich auf das durch die pipettierten Volumina theoretisch erreichte Verhältnis verlassen [72, 75, 98, 120].

In dem Zytotoxizitätsassay dieser Dissertation wurden verschiedene E:T Verhältnisse betrachtet und außerdem die tatsächlich erreichte Ratio überprüft. Anschließend wurde ein Zytotoxizitätsindex pro NK-Zelle für jede Probandin berechnet. Daher könnte dieser Ansatz im Vergleich zu früheren Studien eine weniger voreingenommene Sicht auf die NK-Zell-Zytotoxizität liefern.

In dieser Arbeit konnten keine Veränderungen in der Zytotoxizität der NK-Zellen in Übergewicht oder MetS festgestellt werden.

5.3 Stärken und Schwächen der Arbeit

Eine der größten Stärken dieser Studie war die große, hoch phänotypisierte Kohorte mit jungen Individuen des gleichen Geschlechts und wenig Vorerkrankungen.

Des Weiteren wurden sämtliche Analysen auf einem hohen qualitativen Standard ausgeführt. Dazu gehörte, dass CD45 als Marker zur Validierung des Lymphozytengates beinhaltet war [72]. Außerdem wurde das Gating von zwei Personen ausgewertet und bei Diskrepanzen ein dritter Beurteiler zur Begutachtung herangezogen.

Die tatsächliche Anzahl pipettierter NK-Zellen wurde für jede einzelne Probe überprüft und errechnet. So konnte das reale Verhältnis von NK-Zellen zu K562 bestimmt werden. Dadurch konnten sekundäre Fehler durch unausgewogene Zellverteilungen, die schnell auftreten können, vermieden werden. Zusätzlich wurden statt einer Einzelpunktmessung E:T Verhältnisse in einem großen Umfang mit

einer Spannbreite von 2,5:1 bis 200:1 ermittelt. Durch den daraus für jede Studienteilnehmerin gebildeten Graphen konnte ein guter genereller Überblick über die Zytotoxizität der NK-Zellen gewonnen werden. Der Zytotoxizitätsassay beinhaltete außerdem Positiv- und Negativkontrollen.

Eine Schwäche der Arbeit war der selektive Fokus auf eine Funktion der NK-Zellen, nämlich die der Zytotoxizität. Dies erschwert den Vergleich mit anderen Studien, die andere Funktionen der NK-Zellen untersucht haben, wie beispielsweise die IFN- γ Sekretion, die CD107a Expression oder die Lactatdehydrogenase-Aktivität [75, 98, 113].

Außerdem wurden keine Subtypen von NK-Zellen untersucht, wie beispielsweise die Typen CD56^{dim} und CD56^{bright}. Diesbezüglich wurde festgestellt, dass der Anteil an CD56^{dim} NK-Zellen während der Schwangerschaft und frühen postpartalen Phase verändert ist [121]. Somit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die NK-Zell-Charakteristika in der Studienkohorte dieser Dissertation noch durch die kürzliche Schwangerschaft verändert waren.

Zudem wurden wie in den meisten erwähnten Studien nur die NK-Zellen des peripheren Blutes betrachtet. Da NK-Zellen auch die Fähigkeit besitzen, in andere Gewebe auszuwandern, wäre auch eine Betrachtung ihres Phänotyps in anderen Kompartimenten von Interesse [122].

Ein Nachteil der Studienkohorte war, dass nur wenige Teilnehmerinnen das Vollbild des MetS erfüllten. Daher wurden größtenteils Probandinnen mit schwächeren Ausprägungen untersucht. Folglich könnte es sein, dass Veränderungen der NK-Zell-Charakteristika erst bei ausgeprägteren Formen des MetS in Erscheinung treten. Die spezifische, homogene Kohorte war Vor- und Nachteil zugleich. Die hier beobachteten negativen Ergebnisse könnten in einer bevölkerungsbasierenden Stichprobe anders ausfallen.

6 Zusammenfassung

GDM, Übergewicht und MetS stellen allesamt Risikofaktoren für die Entwicklung eines T2D dar [29–32]. In der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob Veränderungen der NK-Zellen bei Frauen mit oder ohne GDM in der Vergangenheit sowie bei Frauen mit verschiedenen Ausprägungsgraden von Übergewicht oder des MetS vorliegen.

In bisherigen Studien wurden oftmals eine verminderte NK-Zahl und Funktion bei gleichzeitig erhöhtem NK-Zell-Aktivierungsstatus bei Personen mit Übergewicht und/oder MetS berichtet. In der homogenen, hoch phänotypisierten Studienkohorte PPSDiab konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden. Extreme Phänotypen von Übergewicht und MetS könnten die unterschiedlichen Ergebnisse früherer Studien erklären.

Durch die Betrachtung der relativen und absoluten NK-Zahl, des Anteils aktivierter $CD69^+$ NK-Zellen sowie ihrer Funktion in Form von Zytotoxizität konnte ein guter Überblick über den generellen NK-Zell-Status der Studienteilnehmerinnen gewonnen werden. Hierbei konnten keine signifikanten Veränderungen in den untersuchten Risikogruppen GDM, Übergewicht und MetS festgestellt werden.

Somit deuten diese Ergebnisse nicht darauf hin, dass die NK-Zellen im Zusammenhang mit dem erhöhten Diabetesrisiko stehen.

Veränderungen in Subgruppen von NK-Zellen oder anderen Bereichen der Zellfunktion sind jedoch denkbar und könnten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist nicht darauf hin, dass die Anzahl und Funktion der NK-Zellen im peripheren Blut an der frühen Pathogenese von T2D beteiligt ist. Entsprechende Annahmen früherer Studien konnten hier nicht bestätigt werden. Dies schließt nicht aus, dass innerhalb der relevanten Gewebe, z.B. im viszeralen Fett, NK-Zellen an der metabolischen Inflammation beteiligt sind. Das müsste in anderen Versuchsansätzen, beispielsweise mit Gewebeproben, überprüft werden. Zudem können natürlich andere Komponenten der zellulären Immunität in frühen Vorstadien von T2D eine Rolle spielen. Eine vermehrte lokale und systemische Inflammation ist hier in jedem Fall schon oft zu finden.

Die in dieser Arbeit analysierte PPSDiab Kohorte bietet noch viele Möglichkeiten, weitere Hypothesen in dieser Richtung zu überprüfen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe, Deutscher Gesundheitsbericht - Diabetes 2023 - Die Bestandsaufnahme. Verlag Kirchheim + Co GmbH. 2022.
- [2] International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, 10th Edition, 2021, verfügbar unter <https://diabetesatlas.org/>, Zugriff am 05.04.24
- [3] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Feb;14(2):88-98. doi: 10.1038/nrendo.2017.151. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29219149.
- [4] Destatis Statistisches Bundesamt. Krankheitskosten für Diabetes mellitus. 2020, Verfügbar unter <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23631-0003&sachmerkmal=ICD10Y&sachschluessel=ICD10-E10-E14&transponieren=true#abreadcrumb>, Zugriff am 23.04.24.
- [5] Tuomi, T., et al., The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*, 2014. 383(9922): p. 1084-94.
- [6] Harreiter J, Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2023) [Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023)]. *Wien Klin Wochenschr*. 2023 Jan;135(Suppl 1):7-17. German. doi: 10.1007/s00508-022-02122-y. Epub 2023 Apr 20. PMID: 37101021; PMCID: PMC10133036.
- [7] American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-

-
2022. *Diabetes Care*. 2022 Jan 1;45(Suppl 1):S17-S38. doi: 10.2337/dc22-S002. PMID: 34964875.
- [8] Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes – Langfassung. Version 3.0. 2023 [cited: 2024-07-26]. DOI: 10.6101/AZQ/000503. www.leitlinien.de/diabetes. Internet: www.leitlinien.de, www.awmf.org.
- [9] World Health Organization & International Diabetes Federation. (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia : report of a WHO/IDF consultation. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/43588> , Zugriff am 26.07.24.
- [10] Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG),S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes, 2. Auflage S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes. Auflage 2, 2018, verfügbar unter: https://www.ddg.info/fileadmin/user_upload/05_Behandlung/01_Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/2018/S3-LL-Therapie-Typ-1-Diabetes-Auflage-2-Langfassung-09042018.pdf, Zugriff am 26.07.24 .
- [11] Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG), *Diabetologie* 2020; 15 (Suppl 1): S9–S17. DOI:10.1055/a-1193-3185, verfügbar unter https://www.ddg.info/fileadmin/user_upload/05_Behandlung/01_Leitlinien/Praxisempfehlungen/2020/dus_2020_S01_Praxisempfehlungen_Klassifikation-und-Diagnostik_Schleicher_01.pdf, Zugriff am 26.07.24.
- [12] Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016 Nov 23;355:i5953. doi: 10.1136/bmj.i5953. PMID: 27881363; PMCID: PMC5121106.
- [13] Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012 Jun 16;379(9833):2279-90. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60283-9. Epub 2012 Jun 9. PMID: 22683128; PMCID: PMC3891203.
- [14] Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or

-
- metformin. *N Engl J Med.* 2002 Feb 7;346(6):393-403. doi: 10.1056/NEJ-Moa012512. PMID: 11832527; PMCID: PMC1370926.
- [15] Gregg EW, Chen H, Wagenknecht LE, Clark JM, Delahanty LM, Bantle J, Pownall HJ, Johnson KC, Safford MM, Kitabchi AE, Pi-Sunyer FX, Wing RR, Bertoni AG; Look AHEAD Research Group. Association of an intensive lifestyle intervention with remission of type 2 diabetes. *JAMA.* 2012 Dec 19;308(23):2489-96. doi: 10.1001/jama.2012.67929. PMID: 23288372; PMCID: PMC4771522.
- [16] Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am J Clin Nutr.* 2005 Mar;81(3):555-63. doi: 10.1093/ajcn/81.3.555. PMID: 15755822.
- [17] Tanamas SK, Reddy SP, Chambers MA, Clark EJ, Dunnigan DL, Hanson RL, Nelson RG, Knowler WC, Sinha M. Effect of severe obesity in childhood and adolescence on risk of type 2 diabetes in youth and early adulthood in an American Indian population. *Pediatr Diabetes.* 2018 Jun;19(4):622-629. doi: 10.1111/pedi.12627. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29282818.
- [18] Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, Speizer FE, Manson JE. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1997 Apr 1;145(7):614-9. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009158. PMID: 9098178.
- [19] Wu S, Fisher-Hoch SP, Reninger B, Vatcheva K, McCormick JB. Metabolic Health Has Greater Impact on Diabetes than Simple Overweight/Obesity in Mexican Americans. *J Diabetes Res.* 2016;2016:4094876. doi: 10.1155/2016/4094876. Epub 2016 Jan 10. PMID: 26881247; PMCID: PMC4736910.
- [20] Wang G, Radovick S, Xu X, Xing H, Tang G, Bartell TR, Wang B, Wang X. Strategy for early identification of prediabetes in lean populations: New insight from a prospective Chinese twin cohort of children and young adults. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Dec;146:101-110. doi: 10.1016/j.diabres.2018.10.003. Epub 2018 Oct 9. PMID: 30312713.

-
- [21] Crook M. Type 2 diabetes mellitus: a disease of the innate immune system? An update. *Diabet Med.* 2004 Mar;21(3):203-7. doi: 10.1046/j.1464-5491.2003.01030.x. PMID: 15008827.
- [22] International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel; Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva Ad, Hod M, Kitzmiller JL, Lowe LP, McIntyre HD, Oats JJ, Omori Y, Schmidt MI. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care.* 2010 Mar;33(3):676-82. doi: 10.2337/dc09-1848. PMID: 20190296; PMCID: PMC2827530.
- [23] Gemeinsamer Bundesausschuss, Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Geburt (Mutterschafts-Richtlinie/Mu-RL), 2023, verfügbar unter https://www.g-ba.de/downloads/62-492-3335/Mu-RL_2023-09-28_iK-2023-12-19.pdf, Zugriff am 26.07.24
- [24] Deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG) und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 2. Auflage, AWMF-Registernummer: 057-008, verfügbar unter https://register.awmf.org/assets/guidelines/057-0081_S3_Gestationsdiabetes-mellitus-GDM-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2019-06.pdf, Zugriff am 01.05.24.
- [25] Robert Koch Institut, Diabetes surveillance, Prävalenz Gestationsdiabetes, 2021, verfügbar unter: https://diabsurv.rki.de/Webs/Diabsurv/DE/diabetes-in-deutschland/1-02_Praevalenz_Gestationsdiabetes.html, Zugriff am 02.05.24.
- [26] ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL, Kahan S, Khunti K, Leon J, Lyons SK, Perry ML, Prahalad P, Pratley RE, Jeffrie Seley J, Stanton RC, Gabbay RA, on behalf of the American Diabetes Association. 15. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care.* 2023 Jan 1;46(Suppl 1):S254-S266. doi: 10.2337/dc23-S015. PMID: 36507645; PMCID: PMC9810465.

-
- [27] Linnenkamp U, Greiner GG, Haastert B, Adamczewski H, Kaltheuner M, Weber D, Icks A. Postpartum screening of women with GDM in specialised practices: Data from 12,991 women in the GestDiab register. *Diabet Med*. 2022 Jul;39(7):e14861. doi: 10.1111/dme.14861. Epub 2022 May 3. PMID: 35472098.
- [28] Dennison RA, Chen ES, Green ME, Legard C, Kotecha D, Farmer G, Sharp SJ, Ward RJ, Usher-Smith JA, Griffin SJ. The absolute and relative risk of type 2 diabetes after gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis of 129 studies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021 Jan;171:108625. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108625. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33333204; PMCID: PMC7610694.
- [29] Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2009 May 23;373(9677):1773-9. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60731-5. PMID: 19465232.
- [30] Vounzoulaki E, Khunti K, Abner SC, Tan BK, Davies MJ, Gillies CL. Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020 May 13;369:m1361. doi: 10.1136/bmj.m1361. PMID: 32404325; PMCID: PMC7218708.
- [31] Regufe VMG, Pinto CMCB, Perez PMVHC. Metabolic syndrome in type 2 diabetic patients: a review of current evidence. *Porto Biomed J*. 2020 Dec 3;5(6):e101. doi: 10.1097/j.pbj.000000000000101. PMID: 33299950; PMCID: PMC7721212.
- [32] Carlos Lorenzo, Mayor Okoloise, Ken Williams, Michael P. Stern, Steven M. Haffner; The Metabolic Syndrome as Predictor of Type 2 Diabetes: The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1 November 2003; 26 (11): 3153–3159. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.11.3153>.
- [33] Ashwal E, Hod M. Gestational diabetes mellitus: Where are we now? *Clin Chim Acta*. 2015 Dec 7;451(Pt A):14-20. doi: 10.1016/j.cca.2015.01.021. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25655741.
- [34] Akinci B, Celtik A, Yener S, Yesil S. Prediction of developing metabolic syndrome after gestational diabetes mellitus. *Fertil Steril*. 2010 Mar

-
- 1;93(4):1248-54. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.007. Epub 2009 Jan 14. PMID: 19147138.
- [35] Neuhauser HK, Ellert U: Prävalenz des metabolischen Syndroms in Deutschland: eine Sensitivitätsanalyse. *gms german medical science* 2005; Meeting abstract, <http://www.egms.de/en/meetings/gmds2005/05gmds183.shtml>.
- [36] Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640-5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644. Epub 2009 Oct 5. PMID: 19805654.
- [37] Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):433-8. doi: 10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6. PMID: 14744958.
- [38] Bolen CR, Uduman M, Kleinstein SH. Cell subset prediction for blood genomic studies. *BMC Bioinformatics*. 2011 Jun 24;12:258. doi: 10.1186/1471-2105-12-258. PMID: 21702940; PMCID: PMC3213685.
- [39] Ferrante, A. and Y.H. Thong, Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods*, 1980. 36(2): p. 109-17.
- [40] Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009 Apr;Chapter 7:7.1.1-7.1.8. doi: 10.1002/0471142735.im0701s85. PMID: 19347849.

-
- [41] Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol.* 2016;1304:53-61. doi: 10.1007/7651201499. PMID: 25092056.
- [42] Weinberg A, Song LY, Wilkening C, Sevin A, Blais B, Louzao R, Stein D, Defechereux P, Durand D, Riedel E, Raftery N, Jesser R, Brown B, Keller MF, Dickover R, McFarland E, Fenton T; Pediatric ACTG Cryopreservation Working Group. Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Aug;16(8):1176-86. doi: 10.1128/CVI.00342-08. Epub 2009 Jun 10. PMID: 19515870; PMCID: PMC2725535.
- [43] Marcenaro E, Notarangelo LD, Orange JS, Vivier E. Editorial: NK Cell Subsets in Health and Disease: New Developments. *Front Immunol.* 2017 Oct 18;8:1363. doi: 10.3389/fimmu.2017.01363. PMID: 29093717; PMCID: PMC5651263.
- [44] Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990 Jul;11(7):237-44. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-s. PMID: 2201309.
- [45] Del Zotto G, Marcenaro E, Vacca P, Sivori S, Pende D, Della Chiesa M, Moretta F, Ingegnere T, Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017 Mar;92(2):100-114. doi: 10.1002/cyto.b.21508. Epub 2017 Feb 12. PMID: 28054442.
- [46] Kumar, V., McNerney, M. A new self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 5, 363–374 (2005). <https://doi.org/10.1038/nri1603>.
- [47] Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:619-48. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.619. PMID: 8717527.
- [48] Arundhati Mandal, Chandra Viswanathan, Natural killer cells: In health and disease, *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, Volume 8, Issue 2, 2015, Pages 47-55, ISSN 1658-3876.

-
- [49] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011 Jan 7;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687. PMID: 21212348; PMCID: PMC3089969.
- [50] Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol*. 2016 Jan;12(1):15-28. doi: 10.1038/nrendo.2015.189. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26553134.
- [51] Wensveen FM, Jelenčić V, Valentić S, Šestan M, Wensveen TT, Theurich S, Glasner A, Mendrila D, Štimac D, Wunderlich FT, Brüning JC, Mandelboim O, Polić B. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat Immunol*. 2015 Apr;16(4):376-85. doi: 10.1038/ni.3120. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25729921.
- [52] O'Rourke RW, Meyer KA, Neeley CK, Gaston GD, Sekhri P, Szumowski M, Zamarron B, Lumeng CN, Marks DL. Systemic NK cell ablation attenuates intra-abdominal adipose tissue macrophage infiltration in murine obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Oct;22(10):2109-14. doi: 10.1002/oby.20823. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24962029; PMCID: PMC4180782.
- [53] Liu M, Liang S and Zhang C (2021) NK Cells in Autoimmune Diseases: Protective or Pathogenic? *Front. Immunol*. 12:624687. doi: 10.3389/fimmu.2021.624687.
- [54] Melanie Rodacki, Britta Svoren, Vincent Butty, Whitney Besse, Lori Laffel, Christophe Benoist, Diane Mathis; Altered Natural Killer Cells in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes* 1 January 2007; 56 (1): 177–185.
- [55] Negishi K, Waldeck N, Chandy G, Buckingham B, Kershner A, Fisher L, Gupta S, Charles MA. Natural killer cell and islet killer cell activities in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986 Jun;29(6):352-7. doi: 10.1007/BF00903343. PMID: 3527835.
- [56] Hussain MJ, Alviggi L, Millward BA, Leslie RD, Pyke DA, Vergani D. Evidence that the reduced number of natural killer cells in type 1 (insulin-dependent) diabetes may be genetically determined. *Diabetologia*. 1987 Dec;30(12):907-11. doi: 10.1007/BF00295872. PMID: 3436487.
- [57] Scheinin T, Mäenpää J, Kontiainen S. Immune responses to insulin and lymphocyte subclasses at diagnosis of insulin-dependent diabetes and one

-
- year later. *Immunobiology*. 1990 Jun;180(4-5):431-40. doi: 10.1016/s0171-2985(11)80304-9. PMID: 2204602.
- [58] Lorini R, Moretta A, Valtorta A, d'Annunzio G, Cortona L, Vitali L, Bozzola M, Severi F. Cytotoxic activity in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1994 Feb;23(1):37-42. doi: 10.1016/0168-8227(94)90125-2. PMID: 7516851.
- [59] Akesson C, Uvebrant K, Oderup C, Lynch K, Harris RA, Lernmark A, Agardh CD, Cilio CM. Altered natural killer (NK) cell frequency and phenotype in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) prior to insulin deficiency. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jul 1;161(1):48-56. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04114.x. Epub 2010 Apr 9. PMID: 20408863; PMCID: PMC2940148.
- [60] Wang Y, Yuan W, Guo H, Jiang Y. High frequency of activated NKp46(+) natural killer cells in patients with new diagnosed of latent autoimmune diabetes in adults. *Autoimmunity*. 2015 Jun;48(4):267-73. doi: 10.3109/08916934.2014.990629. Epub 2014 Dec 12. PMID: 25495606.
- [61] Oras A, Peet A, Giese T, Tillmann V, Uibo R. A study of 51 subtypes of peripheral blood immune cells in newly diagnosed young type 1 diabetes patients. *Clin Exp Immunol*. 2019 Oct;198(1):57-70. doi: 10.1111/cei.13332. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31116879; PMCID: PMC6718284.
- [62] Singh K, Martinell M, Luo Z, Espes D, Stålhammar J, Sandler S, Carlsson PO. Cellular immunological changes in patients with LADA are a mixture of those seen in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2019 Jul;197(1):64-73. doi: 10.1111/cei.13289. Epub 2019 Mar 24. PMID: 30843600; PMCID: PMC6591143.
- [63] Wilson RG, Anderson J, Shenton BK, White MD, Taylor RM, Proud G. Natural killer cells in insulin dependent diabetes mellitus. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Jul 26;293(6541):244. doi: 10.1136/bmj.293.6541.244. PMID: 3089475; PMCID: PMC1341181.
- [64] Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A, Peraldi MN. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013 Apr 25;8(4):e62418. doi: 10.1371/journal.pone.0062418. PMID: 23638076; PMCID: PMC3636194.

-
- [65] Kim JH, Park K, Lee SB, Kang S, Park JS, Ahn CW, Nam JS. Relationship between natural killer cell activity and glucose control in patients with type 2 diabetes and prediabetes. *J Diabetes Investig.* 2019 Sep;10(5):1223-1228. doi: 10.1111/jdi.13002. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30618112; PMCID: PMC6717814.
- [66] Piątkiewicz P, Milek T, Bernat-Karpińska M, Ohams M, Czech A, Ciostek P. The dysfunction of NK cells in patients with type 2 diabetes and colon cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013 Jun;61(3):245-53. doi: 10.1007/s00005-013-0222-5. Epub 2013 Mar 2. PMID: 23456207.
- [67] Sieniawska J, Krzewska A, Skowronek A, Wrobel W, Tomczyk Z, Pach E, Rosolowska I, Wilczynska B, Beń-Skowronek I. Lower percentages of natural killer cells in children with type 1 diabetes and their siblings. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2023;29(4):214-224. doi: 10.5114/ped.m.2023.132029. PMID: 38282490; PMCID: PMC10826694.
- [68] Allahyani M, Alshalawi AM, Alshalawii MR, Alqorashi SA, Aljuaid A, Almehmadi MM, Bokhary MA, Albrgey AS, Alghamdi AA, Aldairi AF, Alhazmi AS. Phenotypical evaluation of lymphocytes and monocytes in patients with type 2 diabetes mellitus in Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 2023 Mar;44(3):296-305. doi: 10.15537/smj.2023.44.3.20220873. PMID: 36940958; PMCID: PMC10043885.
- [69] Barcenilla H, Åkerman L, Pihl M, Ludvigsson J, Casas R. Mass Cytometry Identifies Distinct Subsets of Regulatory T Cells and Natural Killer Cells Associated With High Risk for Type 1 Diabetes. *Front Immunol.* 2019 May 3;10:982. doi: 10.3389/fimmu.2019.00982. PMID: 31130961; PMCID: PMC6509181.
- [70] Poirot L, Benoist C, Mathis D. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 25;101(21):8102-7. doi: 10.1073/pnas.0402065101. Epub 2004 May 12. PMID: 15141080; PMCID: PMC419564.
- [71] Lynch LA, O'Connell JM, Kwasnik AK, Cawood TJ, O'Farrelly C, O'Shea DB. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? *Obesity (Silver Spring).* 2009 Mar;17(3):601-5. doi: 10.1038/o-by.2008.565. Epub 2008 Dec 18. PMID: 19238145.

-
- [72] O'Shea D, Cawood TJ, O'Farrelly C, Lynch L. Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. *PLoS One*. 2010 Jan 25;5(1):e8660. doi: 10.1371/journal.pone.0008660. PMID: 20107494; PMCID: PMC2801590.
- [73] Tobin LM, Mavinkurve M, Carolan E, Kinlen D, O'Brien EC, Little MA, Finlay DK, Cody D, Hogan AE, O'Shea D. NK cells in childhood obesity are activated, metabolically stressed, and functionally deficient. *JCI Insight*. 2017 Dec 21;2(24):e94939. doi: 10.1172/jci.insight.94939. PMID: 29263296; PMCID: PMC5752310.
- [74] Rodríguez CP, González MC, Aguilar-Salinas CA, Nájera-Medina O. Peripheral Lymphocytes, Obesity, and Metabolic Syndrome in Young Adults: An Immunometabolism Study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2018 Sep;16(7):342-349. doi: 10.1089/met.2018.0005. Epub 2018 Jun 29. PMID: 29957122.
- [75] Kim M, Kim M, Yoo HJ, Lee JH. Natural Killer Cell Activity and Interleukin-12 in Metabolically Healthy versus Metabolically Unhealthy Overweight Individuals. *Front Immunol*. 2017 Nov 29;8:1700. doi: 10.3389/fimmu.2017.01700. Erratum in: *Front Immunol*. 2018 Sep 20;9:2179. PMID: 29238351; PMCID: PMC5712537.
- [76] Jung YS, Park JH, Park DI, Sohn CI, Lee JM, Kim TI. Physical Inactivity and Unhealthy Metabolic Status Are Associated with Decreased Natural Killer Cell Activity. *Yonsei Med J*. 2018 Jun;59(4):554-562. doi: 10.3349/ymj.2018.59.4.554. PMID: 29749139; PMCID: PMC5949298.
- [77] O'Rourke RW, Gaston GD, Meyer KA, White AE, Marks DL. Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism*. 2013 Nov;62(11):1557-61. doi: 10.1016/j.metabol.2013.07.011. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24012153; PMCID: PMC3809342.
- [78] Viel S, Besson L, Charrier E, Marçais A, Disse E, Bienvenu J, Walzer T, Dumontet C. Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clin Immunol*. 2017 Apr;177:12-17. doi: 10.1016/j.clim.2016.01.007. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26794911.
- [79] Michelet X, Dyck L, Hogan A, Loftus RM, Duquette D, Wei K, Beyaz S, Tavakkoli A, Foley C, Donnelly R, O'Farrelly C, Raverdeau M, Vernon A, Pettee W, O'Shea D, Nikolajczyk BS, Mills KHG, Brenner MB, Finlay

-
- D, Lynch L. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. *Nat Immunol.* 2018 Dec;19(12):1330-1340. doi: 10.1038/s41590-018-0251-7. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30420624.
- [80] Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet.* 2000 Nov 25;356(9244):1795-9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03231-1. PMID: 11117911.
- [81] Rottenkolber M, Ferrari U, Holland L, Aertsen S, Kammer NN, Hetterich H, Fugmann M, Banning F, Weise M, Sacco V, Kohn D, Freiboth I, Hutter S, Hasbargen U, Lehmann R, Grallert H, Parhofer KG, Seissler J, Lechner A. The Diabetes Risk Phenotype of Young Women With Recent Gestational Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jun;100(6):E910-8. doi: 10.1210/jc.2014-3898. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25742512.
- [82] Gar C, Rottenkolber M, Grallert H, Banning F, Freiboth I, Sacco V, Wichmann C, Reif S, Potzel A, Dauber V, Schendell C, Sommer NN, Wolfarth B, Seissler J, Lechner A, Ferrari U. Physical fitness and plasma leptin in women with recent gestational diabetes. *PLoS One.* 2017 Jun 13;12(6):e0179128. doi: 10.1371/journal.pone.0179128. PMID: 28609470; PMCID: PMC5469459.
- [83] Bosity-Westphal A, Later W, Hitze B, Sato T, Kossel E, Gluer CC, Heller M, Müller MJ. Accuracy of bioelectrical impedance consumer devices for measurement of body composition in comparison to whole body magnetic resonance imaging and dual X-ray absorptiometry. *Obes Facts.* 2008;1(6):319-24. doi: 10.1159/000176061. Epub 2008 Dec 2. PMID: 20054195; PMCID: PMC6452160.
- [84] Bosity-Westphal A, Schautz B, Later W, Kehayias JJ, Gallagher D, Müller MJ. What makes a BIA equation unique? Validity of eight-electrode multi-frequency BIA to estimate body composition in a healthy adult population. *Eur J Clin Nutr.* 2013 Jan;67 Suppl 1:S14-21. doi: 10.1038/ejcn.2012.160. PMID: 23299866.
- [85] Crowley LC, Marfell BJ, Christensen ME, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Jul 1;2016(7). doi: 10.1101/pdb.prot087155. PMID: 27371594.

-
- [86] Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, Schloot NC; T-Cell Workshop Committee, Immunology of Diabetes Society. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol.* 2011 Jan;163(1):33-49. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04272.x. Epub 2010 Oct 5. PMID: 20939860; PMCID: PMC3010910.
- [87] Draenert R, Verrill CL, Tang Y, Allen TM, Wurcel AG, Boczanowski M, Lechner A, Kim AY, Suscovich T, Brown NV, Addo MM, Walker BD. Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2004 Jan;78(2):630-41. doi: 10.1128/jvi.78.2.630-641.2004. PMID: 14694094; PMCID: PMC368768.
- [88] Disis ML, dela Rosa C, Goodell V, Kuan LY, Chang JC, Kuus-Reichel K, Clay TM, Kim Lyerly H, Bhatia S, Ghanekar SA, Maino VC, Maecker HT. Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *J Immunol Methods.* 2006 Jan 20;308(1-2):13-8. doi: 10.1016/j.jim.2005.09.011. Epub 2005 Oct 21. PMID: 16337957.
- [89] Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin BQ, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, Stockinger H, van Zelm MC, Zola H, Clark G. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol.* 2015 Nov 15;195(10):4555-63. doi: 10.4049/jimmunol.1502033. PMID: 26546687.
- [90] Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187-376. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60664-1. PMID: 2683611; PMCID: PMC7131425.
- [91] Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics.* 2012;6:73-82. doi: 10.2147/BTT.S23976. Epub 2012 Apr 5. PMID: 22532775; PMCID: PMC3333822.
- [92] Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):648-55. doi: 10.1038/nri1416. PMID: 15286731.

-
- [93] Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett.* 2018 Apr;196:22-32. doi: 10.1016/j.imlet.2018.01.009. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29366662.
- [94] Kantor A, Roederer M (1997) FACS analysis of lymphocytes. In: Herzenberg LA, Weir DM, Blackwell C (eds) *Handbook of experimental immunology*, vol 2, 5th edn. Blackwell Science, Cambridge.
- [95] Lalor PA, Revell PA. The use of foetal calf serum as a blocking agent in double immunoenzyme-cytochemistry labelling with mouse monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.* 1989 Aug 15;122(1):149-50. doi: 10.1016/0022-1759(89)90346-3. PMID: 2668416.
- [96] Keilen J, Gar C, Rottenkolber M, Fueessl LU, Joseph AT, Draenert R, Seissler J, Lechner A. No association of natural killer cell number and function in peripheral blood with overweight/obesity and metabolic syndrome in a cohort of young women. *Physiol Rep.* 2022 Feb;10(4):e15148. doi: 10.14814/phy2.15148. PMID: 35179822; PMCID: PMC8855889.
- [97] Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975 Mar;45(3):321-34. PMID: 163658.
- [98] Dovio A, Caramello V, Masera RG, Sartori ML, Saba L, Tinivella M, Prolo P, Termine A, Avagnina P, Angeli A. Natural killer cell activity and sensitivity to positive and negative modulation in uncomplicated obese subjects: relationships to leptin and diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004 Jul;28(7):894-901. doi: 10.1038/sj.ijo.0802639. PMID: 15208649.
- [99] Mhatre S, Madkaikar M, Ghosh K, Desai M, Pujari V, Gupta M. Rapid flow cytometry based cytotoxicity assay for evaluation of NK cell function. *Indian J Exp Biol.* 2014 Oct;52(10):983-8. PMID: 25345247.
- [100] Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res.* 1979;3(6):363-70. doi: 10.1016/0145-2126(79)90033-x. PMID: 95026.
- [101] Nishimura M, Mitsunaga S, Akaza T, Mitomi Y, Tadokoro K, Juji T. Protection against natural killer cells by interferon-gamma treatment of K562

-
- cells cannot be explained by augmented major histocompatibility complex class I expression. *Immunology*. 1994 Sep;83(1):75-80. PMID: 7821970; PMCID: PMC1415012.
- [102] Piriou L, Chilmonczyk S, Genetet N, Albina E. Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry*. 2000 Dec 1;41(4):289-97. doi: 10.1002/1097-0320(20001201)41:4<289::aid-cyto7>3.0.co;2-5. PMID: 11084614.
- [103] Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999 Sep;22(9):1462-70. doi: 10.2337/diacare.22.9.1462. PMID: 10480510.
- [104] Lobo TF, Borges CM, Mattar R, Gomes CP, de Angelo AGS, Pendeloski KPT, Daher S. Impaired Treg and NK cells profile in overweight women with gestational diabetes mellitus. *Am J Reprod Immunol*. 2018 Mar;79(3). doi: 10.1111/aji.12810. Epub 2018 Jan 5. PMID: 29315988.
- [105] Xiong Y, Wang Y, Wu M, Chen S, Lei H, Mu H, Yu H, Hou Y, Tang K, Chen X, Dong J, Wang X, Chen L. Aberrant NK cell profile in gestational diabetes mellitus with fetal growth restriction. *Front Immunol*. 2024 Feb 5;15:1346231. doi: 10.3389/fimmu.2024.1346231. PMID: 38375483; PMCID: PMC10875967.
- [106] Musumeci A, McElwain CJ, Manna S, McCarthy F, McCarthy C. Exposure to Gestational Diabetes Mellitus increases subclinical inflammation mediated in part by obesity. *Clin Exp Immunol*. 2024 Feb 9:uxae010. doi: 10.1093/cei/uxae010. Epub ahead of print. PMID: 38334487.
- [107] Hara Cde C, França EL, Fagundes DL, de Queiroz AA, Rudge MV, Honorio-França AC, Calderon Ide M. Characterization of Natural Killer Cells and Cytokines in Maternal Placenta and Fetus of Diabetic Mothers. *J Immunol Res*. 2016;2016:7154524. doi: 10.1155/2016/7154524. Epub 2016 May 16. PMID: 27294162; PMCID: PMC4884836.
- [108] Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*. 2014 Apr;141(4):483-9. doi: 10.1111/imm.12224. PMID: 24303897; PMCID: PMC3956422.

-
- [109] Ryder E, Diez-Ewald M, Mosquera J, Fernández E, Pedrañez A, Vargas R, Peña C, Fernández N. Association of obesity with leukocyte count in obese individuals without metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr*. 2014 Oct-Dec;8(4):197-204. doi: 10.1016/j.dsx.2014.09.002. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25301008.
- [110] Li B, Yang C, Jia G, Liu Y, Wang N, Yang F, Su R, Shang Y, Han Y. Comprehensive evaluation of the effects of long-term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. *BMC Immunol*. 2022 Jun 7;23(1):30. doi: 10.1186/s12865-022-00505-4. PMID: 35672664; PMCID: PMC9175382.
- [111] Sun J, Gao M, Li K, Qin L, Sun H, Qiao G, Zhao Y, Zhang Y. Quality of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells Recovered from the Hepatitis/AIDS Biobank. *Biopreserv Biobank*. 2018 Dec;16(6):397-401. doi: 10.1089/bio.2018.0050. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30481049.
- [112] Laue T, Wrann CD, Hoffmann-Castendiek B, Pietsch D, Hübner L, Kielstein H. Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obes*. 2015 Jan 24;2:1. doi: 10.1186/s40608-014-0033-1. PMID: 26217516; PMCID: PMC4511543.
- [113] Bähr I, Jahn J, Zipprich A, Pahlow I, Spielmann J, Kielstein H. Impaired natural killer cell subset phenotypes in human obesity. *Immunol Res*. 2018 Apr;66(2):234-244. doi: 10.1007/s12026-018-8989-4. PMID: 29560551; PMCID: PMC5899081.
- [114] Moulin CM, Marguti I, Peron JP, Halpern A, Rizzo LV. Bariatric surgery reverses natural killer (NK) cell activity and NK-related cytokine synthesis impairment induced by morbid obesity. *Obes Surg*. 2011 Jan;21(1):112-8. doi: 10.1007/s11695-010-0250-8. PMID: 20803097.
- [115] Jahn J, Spielau M, Brandsch C, Stangl GI, Delank KS, Bähr I, Berreis T, Wrann CD, Kielstein H. Decreased NK cell functions in obesity can be reactivated by fat mass reduction. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Nov;23(11):2233-41. doi: 10.1002/oby.21229. Epub 2015 Sep 22. PMID: 26390898.
- [116] Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol*

-
- Cell Biol. 2008 May;9(5):367-77. doi: 10.1038/nrm2391. PMID: 18401346; PMCID: PMC2886982.
- [117] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):840-6. doi: 10.1038/nature05482. PMID: 17167471.
- [118] McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):7-18. doi: 10.2337/diabetes.51.1.7. PMID: 11756317.
- [119] Catapano AL, Pirillo A, Bonacina F, Norata GD. HDL in innate and adaptive immunity. *Cardiovasc Res*. 2014 Aug 1;103(3):372-83. doi: 10.1093/cvr/cvu150. Epub 2014 Jun 15. PMID: 24935428.
- [120] Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *J Nutr*. 2007 May;137(5):1236-43. doi: 10.1093/jn/137.5.1236. PMID: 17449587.
- [121] Kraus TA, Engel SM, Sperling RS, Kellerman L, Lo Y, Wallenstein S, Escribese MM, Garrido JL, Singh T, Loubeau M, Moran TM. Characterizing the pregnancy immune phenotype: results of the viral immunity and pregnancy (VIP) study. *J Clin Immunol*. 2012 Apr;32(2):300-11. doi: 10.1007/s10875-011-9627-2. Epub 2011 Dec 24. PMID: 22198680; PMCID: PMC7086597.
- [122] Vitale M, Caligiuri MA and Sivori S (2020) Editorial: Natural Killer Cells in Tissue Compartments. *Front. Immunol*. 11:258. doi: 10.3389/fimmu.2020.00258.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst einmal vielen lieben Dank an Herrn Prof. Dr. med. Andreas Lechner für die Möglichkeit, in der Diabetes Research Group der LMU München zu promovieren. Hier habe ich eine sehr menschliche Arbeitsatmosphäre mit tollem Teamzusammenhalt kennengelernt, zu dem er maßgeblich beigetragen hat. Vom Anfang bis zum Ende der Dissertation wurde ich sehr gut angeleitet und unterstützt. Danke für die schöne und lehrreiche Zeit an Prof. Lechner und das gesamte Team.

Ein besonderer Dank auch an Frau Dr. Christina Gar für die Hilfsbereitschaft in allen Belangen und die wertvolle Unterstützung bei der Dissertation.

Danken möchte ich Frau Marietta Rottenkolber, ohne deren hervorragendes statistisches Fachwissen die Arbeit in der vorliegenden Form nicht hätte entstehen können.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. Rika Draenert für die Hilfe bei der Themenfindung und Frau Renate Stirner für die Einarbeitung in die Welt der Durchflusszytometrie.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Frauen, die an dieser Studie teilgenommen haben und allen wissenschaftlichen MitarbeiterInnen des Diabeteszentrums der LMU sowie des Helmholtz Zentrum München. Sie alle tragen zu einem besseren Verständnis des Diabetes bei.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen lieben Eltern Rita und Helmut Keilen danken, die mir den Arztberuf ermöglicht haben und deren uneingeschränkte Unterstützung ich in allen Lebensphasen genießen darf.

Nicht zuletzt vielen Dank an meinen Ehemann und besten Freund Moritz Beck. Du hast maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit fertiggestellt habe. Ich kann immer auf dich zählen und bin froh, dich an meiner Seite zu haben.

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

ADA American Diabetes Association

BMI Body Mass Index

CD Cluster-of-differentiation

DMSO Dimethylsulfoxid

FCS fetales Kälberserum

FSC Forward Scatter

GDM Gestationsdiabetes

GPG Gelegenheitsplasmaglukose

HbA1c glykiertes Hämoglobin

HBSS Hanks' balanced salt solution

HDL High-density Lipoprotein

HLDA Human Leukocyte Differentiation Antigens

hsCRP hochsensitives C-reaktives Protein

IADPSG International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups

IFN- γ Interferon-gamma

ISI Insulin-Sensitivitäts-Index

- LADA** Latent Autoimmune Diabetes in the Adult
- LDL** Low-density Lipoprotein
- MAD** Mittlerer arterieller Blutdruck
- MetS** Metabolisches Syndrom
- MHC** Major Histocompatibility Complex
- NCEP ATPIII** National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
- NEFA** nonesterified fatty acids
- NK-Zellen** Natürliche Killerzellen
- NPG** Nüchternplasmaglukose
- oGTT** oraler Glukosetoleranztest
- PBMC** Periphere mononukleäre Blutzellen
- PBS** phosphate buffered saline
- PG** Plasmaglukose
- PPSDiab** Prädiktion, Prävention und Subklassifikation von Schwangerschafts- und Typ 2 Diabetes
- SSC** Sideward Scatter
- T1D** Typ-1-Diabetes
- T2D** Typ-2-Diabetes
- WHO** World Health Organization

10.2 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schichten nach Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation . . .	6
3.1	Gating: Anzahl und Aktivierung der NK-Zellen	19
3.2	Unterscheidung tote und lebende K562 und PBMC	22
3.3	Ermittlung der Steigung als Maß für die Zytotoxizität	24
4.1	Flussdiagramm der Studienkohorte	27
4.2	Gruppenvergleich CD69 ⁺ NK-Zellen (links) und NK-Zell-Funktion (Zytotoxizität, rechts) zwischen den BMI-Kategorien	31
4.3	Gruppenvergleich CD69 ⁺ NK-Zellen (links) und NK-Zell-Funktion (Zytotoxizität, rechts) zwischen den verschiedenen Schweregraden des Metabolischen Syndroms	33

10.3 Tabellenverzeichnis

1.1	Diagnosekriterien Prädiabetes und Diabetes mellitus nach ADA und WHO [6, 7, 9]	2
1.2	Diagnosekriterien Gestationsdiabetes nach IADPSG [22]	4
1.3	Kriterien Metabolisches Syndrom nach NCEP ATPIII [36, 37]	5
3.1	Bestandteile der Blutentnahmen	12
3.2	Durch Titration ermittelte AK-Mengen	17
3.3	E:T Verhältnisse der PBMC (E) und K562 (T)	21
3.4	Positiv- und Negativkontrollen	21
4.1	Baseline-Charakteristika der Studienkohorte (n=273) [96]	28
4.2	Baseline-Charakteristika von Frauen mit (hohes Risiko) und ohne (niedriges Risiko) GDM in der Vergangenheit	30
4.3	Gruppenvergleich der NK-Zell-Charakteristika zwischen schlanken, übergewichtigen und adipösen Frauen [96]	32
4.4	NK-Zell-Charakteristika bei Frauen mit verschiedenen Schweregraden des Metabolischen Syndroms [96]	32
4.5	Korrelationsanalyse der NK-Zellen mit verschiedenen Charakteristika des Metabolischen Syndroms (n = 273)	35
10.1	Probenröhrchen	65
10.2	Messmethoden	65

10.4 Materialliste der Blutentnahmen

Tabelle 10.1: Probenröhrchen

Probenröhrchen	Größe	Hersteller
Kapillare	0,5 ml	Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, Deutschland
Serum S-Monovette	9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serum S-Monovette	2x 4,9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
EDTA S-Monovette	2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
EDTA S-Monovette	7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Natrium-Fluorid S-Monovette	2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Lithium-Heparin	2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
P800	8,5 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ
PaxGene	2,5 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ

Tabelle 10.2: Messmethoden

Messwert-/methode	Hersteller
Enzymatic caloric test (Triglyceride, HDL)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
hs-CRP	Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Deutschland
Plasma Leptin	ELISA "Dual Range", Merck Millipore
NEFA	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland
Glucose HK Gen.3	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Chemiluminescent immunoassay	DiaSorin LIAISON systems, Saluggia, Italien
HbA1c	VARIANT™ II TURBO HbA1c Kit - 2.0, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Super GL	Dr. Müller Gerätebau GmbH Freital, Deutschland



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Beck, Julia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Anzahl und Funktion natürlicher Killerzellen in Risikogruppen für Typ-2-Diabetes

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Saarburg, 07.06.2025

Ort, Datum

Julia Beck

Unterschrift Julia Beck



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Ihr Name: Julia Beck

Ihre Adresse: Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Ziemssenstraße 5, 80336 München

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

Anzahl und Funktion natürlicher Killerzellen in Risikogruppen für Typ-2-Diabetes

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Saarburg, 07.06.2025

Ort, Datum

Julia Beck

Unterschrift Julia Beck