

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

**Bioinformatische Analyse immunmodulatorischer
Prozesse in LEW.1AR1-*iddm* Ratten-
einem Rattenmodell des Autoimmundiabetes**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für Biowissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

Rostock, 2014

vorgelegt von:

Thomas Schöppe

aus Rostock

geboren am 19.12.1982 in Stralsund

Gutachter: **Prof. Dr. Markus Tiedge**
Universität Rostock
Medizinische Fakultät
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Prof. Dr. Hubert Bahl
Universität Rostock
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Datum der Einreichung: 17.12.2014

Datum der Verteidigung: 17.07.2015

***“I am a firm believer that without speculation
there is no good and original observation”***

Charles Darwin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. Typ 1 Diabetes mellitus.....	1
1.2. Pathogenese.....	2
1.2.1. Tiermodelle des Typ 1 Diabetes.....	6
1.2.1.1. Das NOD-Mausmodell	6
1.2.1.2. Das BB-Rattenmodell	8
1.2.1.3. Das KDP-Rattenmodell	9
1.2.1.4. Das LEW.1AR1- <i>iddm</i> Rattenmodell	10
1.3. Prädiktion und Risikofaktoren des Typ 1 Diabetes mellitus	13
1.3.1. Suszeptibilitätsbereiche des Menschen und der LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratte	14
1.3.2. Der inflammatorische Prozess des Typ 1 Diabetes mellitus	16
1.3.2.1. Proinflammation: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus	16
1.3.2.2. Antiinflammation: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus	18
1.3.2.3. Regulation: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus.....	19
1.3.2.4. Zelloberflächenmarker: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus.....	20
1.3.3. Entscheidungsbäume als statistische Methode zur Krankheitseinschätzung.....	21
1.4. Prävention des Typ 1 Diabetes mellitus	23
1.5. Zielstellung.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Material	27
2.1.1. Chemikalien	27
2.1.2. Kits.....	28
2.1.3. Geräte.....	28
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	28
2.1.5. Taqman-Sonden	29
2.1.6. Antikörper	29
2.1.7. Tiermodelle und Tierhaltung.....	29
2.2. Methoden.....	30
2.2.1. Untersuchungen am LEW.1AR1- <i>iddm</i> Rattenmodell.....	30
2.2.2. CD4-Immunmodulation durch den monoklonalen Antikörper RIB5/2.....	30
2.2.3. Paraffinierung von Organen.....	31
2.2.4. Haematoxylin und Eosin Färbung (H&E).....	31
2.2.5. Immunfluoreszenzfärbung von Insulin und Glukagon.....	32
2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung des T-Zellrezeptors	32
2.2.7. Bestimmung der Betazellmasse	32
2.2.8. Automatisierte hämatologische Untersuchung.....	33

2.2.9.	Isolation mononukleärer Zellen	33
2.2.10.	RNA-Isolation aus mononukleären Zellen.....	34
2.2.11.	cDNA-Synthese	35
2.2.12.	Real-Time Taqman PCR Analyse	35
2.2.13.	Rat Inflammatory Response & Autoimmunity PCR-Array	36
2.2.14.	Statistische Auswertung der Daten	40
2.2.15.	Decision-Tree Analyse.....	40
3.	Ergebnisse.....	41
3.1.	Bestimmung von infiltrierten und nicht infiltrierten Tieren	41
3.1.1.	Haematoxylin und Eosin Färbung (H&E) des Pankreas	41
3.1.2.	Langerhanssche Inseln der LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tiere	42
3.1.3.	Immunzellinfiltrationen.....	43
3.2.	Rate der Infiltrationen	44
3.3.	Differentialblutbild infiltrierter und nicht infiltrierter Tiere.....	44
3.3.1.	Monozyten und Lymphozyten	44
3.3.2.	Eosinophile-, Neutrophile- und Basophile Granulozyten	45
3.4.	Bestimmung morphologischer Parameter zu spezifischen Zeitpunkten	46
3.4.1.	Bestimmung der Betazellmasse	46
3.5.	Genexpressionsmuster der Biomarker der mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu spezifischen Zeitpunkten	47
3.5.1.	Proinflammatorische Zytokine <i>TNF-α</i> , <i>IFN-γ</i> und <i>IL-1β</i>	48
3.5.2.	Antiinflammatorische Zytokine <i>IL-4</i> und <i>IL-10</i>	49
3.5.3.	T-Zellmarker Gene <i>CTLA4</i> , <i>CD-25</i> und <i>Neuropilin-1</i>	50
3.5.4.	Regulatorische Gene <i>TGF-β</i> , <i>FoxP3</i> und <i>L-Selektin</i>	52
3.6.	Genexpressionsmuster der Biomarker der pankreas-drainierenden Lymphknoten zu spezifischen Zeitpunkten	54
3.6.1.	Proinflammatorische Zytokine <i>TNF-α</i> , <i>IFN-γ</i> und <i>IL-1β</i>	54
3.6.2.	Antiinflammatorische Zytokine <i>IL-4</i> und <i>IL-10</i>	55
3.6.3.	T-Zellmarkergene <i>CTLA4</i> , <i>CD-25</i> und <i>Neuropilin-1</i>	56
3.6.4.	Regulatorische Marker <i>TGF-β</i> , <i>FoxP3</i> und <i>L-Selektin</i>	58
3.7.	Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array 40 Tage.....	59
3.8.	Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array 50 Tage.....	60
3.9.	Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array 60 Tage.....	61
3.10.	Genexpressionsmuster der Biomarker der mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu spezifischen Zeitpunkten nach RIB5/2 Antikörperintervention.....	62
3.10.1.	Proinflammatorische Zytokine <i>TNF-α</i> , <i>IFN-γ</i> und <i>IL-1β</i>	62
3.10.2.	Antiinflammatorische Zytokine <i>IL-4</i> und <i>IL-10</i>	64
3.10.3.	T-Zellmarker Gene <i>CTLA4</i> , <i>CD-25</i> und <i>Neuropilin-1</i>	64
3.10.4.	Regulatorische Gene <i>TGF-β</i> , <i>FoxP3</i> und <i>L-Selektin</i>	65
3.11.	Decision-Tree Analyse	67
3.11.1.	Decision-Tree Zeitpunkt 40 Tage	67

3.11.2.	Decision-Tree Zeitpunkt 45 Tage	68
3.11.3.	Decision-Tree Zeitpunkt 50 Tage	69
3.11.4.	Decision-Tree Zeitpunkt 55 Tage	69
3.11.5.	Decision-Tree Zeitpunkt 60 Tage	70
3.11.6.	Rangliste relevanter Biomarker nach Decision-Treeanalyse.....	70
3.12.	Biologisches Netzwerk zum Zeitpunkt 40 Tage.....	72
3.13.	Biologisches Netzwerk zum Zeitpunkt 50 Tage.....	73
3.14.	Biologisches Netzwerk zum Zeitpunkt 60 Tage.....	74
4.	Diskussion	75
4.1.	LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten-ein Tiermodell zur Beschreibung des Prädiabetes.....	75
4.2.	Die inflammatorischen Prozesse spiegeln sich in der Korrelation zwischen Differentialblutbild und Genexpressionsmuster des peripheren Blutes wider	77
4.3.	Genexpressionsmuster von PBMCs und PLNs korrelieren in der prädiabetischen Phase.....	80
4.4.	Entscheidungsbäume-ein Werkzeug zur prädiktiven Beschreibung des Inselinfiltrationsprozesses	85
4.5.	RIB5/2 Antikörper Intervention bewirkt Suppression der T1DM auslösenden Inflammation.....	89
4.6.	RIB5/2 Antikörperbehandlung spiegelt sich im Genexpressionsmuster des peripheren Blutes wider....	91
4.7.	Verstärkte Expression der regulatorischen Gene <i>CTLA4</i> , <i>FoxP3</i> und <i>L-Selektin</i> als Folge der RIB5/2 Antikörperbehandlung.....	92
4.8.	Zusammenfassende Betrachtung des anti-CD4 RIB5/2 Antikörpers im Vergleich zu anderen immunmodulatorischen Ansätzen	94
5.	Perspektiven	96
6.	Zusammenfassung	97
7.	Literaturverzeichnis	100
	<i>Danksagung</i>	107
	<i>Selbständigkeitserklärung</i>	109

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
<i>A.dest</i>	<i>Aqua destillata</i>
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BB	Bio-Breeding
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
C4b	Komplement Komponente 4-b
Ccl	Chemokin C-C motif ligand
CD-4	Cluster of Differentiation-4
CD-8	Cluster of Differentiation-8
CD-25	Cluster of Differentiation-25
CD62L	Cluster of Differentiation 62L
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
ChgA	Chromogranin A
Cblb	Casitas B-Zell lymphom b
CTLA4	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
Ctrl	Kontrolle
Cxcl	Chemokin C-X-C motif Ligand
d	Tag
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyriobnukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DZ	dendritische Zelle
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FoxP3	Forkhead Box Protein P3
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
IAA	Inselautoantikörper
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes mellitus
IHC	Immunhistochemie
INF- γ	Interferon gamma
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-4	Interleukin-4
IL-10	Interleukin-10
IL-18	Interleukin-18
KDP	komeda diabetes prone
Kng1	Kininogen 1
l	Liter
LETL	Long-Evans Tokushima Lean
LEW	Lewis
L-Selektin	CD62L, Sel1
M	Molar
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
mM	Millimolar
M ϕ	Makrophage
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	non obese diabetic
NRP1	Neuropilin 1
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymeraseketterreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PLN	pankreas-drainierende Lymphknoten
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
rcf	relative Zentrifugalkraft
RIB5/2	Rostock Institut für Biochemie 5/2
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
Sel1	Selektin 1
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zellrezeptor
Th1/2	T-Helferzellen 1/2
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor beta
Tlr4	Toll like Rezeptor 4
Tlr7	Toll like Rezeptor 7
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
TZ	T-Zellen
U	Einheit
WT	Wildtyp
ZnT8A	Zink Transporter 8 Autoantikörper

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IDF-Atlas zur weltweiten Prävalenz von Typ 1 Diabetes im Jahr 2011.....	1
Abbildung 2: Entstehung eines Typ 1 Diabetes mellitus.....	4
Abbildung 3: Autoimmuner Inflammationsprozess des Typ 1 Diabetes mellitus.....	5
Abbildung 4: Entscheidungsbaumbeispiel für die Prädiktion von Diabetes.....	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung des anti CD4 mAb Wirkmechanismus.....	30
Abbildung 6: Ablauf einer Dichtegradientenzentrifugation im Detail.....	34
Abbildung 7: Infiltration des endokrinen Pankreas mit mononukleären Immunzellen in LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten .	41
Abbildung 8: Zerstörung von Insulin- und glukagonpositiven Zellen des endokrinen Pankreas normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten im Alter von 40 Tagen durch mononukleäre Zellinfiltrate.....	42
Abbildung 9: Infiltration der Pankreasinseln durch T-Lymphozyten.....	43
Abbildung 10: Altersabhängige Infiltration des endokrinen Pankreas in normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten.....	44
Abbildung 11: Haemogramm normoglykämischer infiltrierter und nicht infiltrierter LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten im Vergleich zum LEW.1AR1-Kontrollstamm.....	45
Abbildung 12: Haemogramm normoglykämischer infiltrierter und nicht infiltrierter LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten im Vergleich zum LEW.1AR1-Kontrollstamm.....	46
Abbildung 13: Altersabhängige Steigerung der Betazellmasse in normoglykämischen in LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten in Abhängigkeit des Infiltrationsstatus.....	47
Abbildung 14: Altersabhängiger Anstieg der Betazellmasse in LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	47
Abbildung 15: Genexpression proinflammatorischer Zytokine normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren	49
Abbildung 16: Genexpression antiinflammatorischer Zytokine normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	50
Abbildung 17: Genexpression von T-Zellmarkern normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tiere.....	52
Abbildung 18: Genexpression regulatorischer Gene in normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren	53
Abbildung 19: Genexpression proinflammatorischer Zytokine normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.	55
Abbildung 20: Genexpression antiinflammatorischer Zytokine normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	56
Abbildung 21: Genexpression von T-Zellmarkern normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tiere.....	57
Abbildung 22: Genexpression regulatorischer Gene in normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren..	59
Abbildung 23: Inflammations- und Autoimmunitätsarray normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten.	59
Abbildung 24: Dominant exprimierte Chemokingene in infiltrierten LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren	60
Abbildung 25: Inflammations- und Autoimmunitätsarray normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten.	60
Abbildung 26: Dominant exprimierte Chemokingene in infiltrierten LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren	61
Abbildung 27: Inflammations- und Autoimmunitätsarray normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten.	62
Abbildung 28: Dominant exprimierte Chemokingene in infiltrierten LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren	62
Abbildung 29: Relative mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine mit RIB5/2 Antikörper behandelte LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tiere.....	63
Abbildung 30: Relative mRNA-Expression der antiinflammatorischen Zytokine mit RIB5/2 Antikörper behandelte LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tiere.....	64
Abbildung 31: Relative mRNA-Expression der T-Zellmarker RIB5/2 Antikörper behandelte LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tiere.....	65

Abbildung 32: Relative mRNA-Expression regulatorischer Gene von RIB5/2 Antikörper behandelter LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	66
Abbildung 33: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse an 40 Tagen alten normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	68
Abbildung 34: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse an 45 Tagen alten normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	68
Abbildung 35: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse an 50 Tagen alten normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	69
Abbildung 36: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse an 55 Tagen alten normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	70
Abbildung 37: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse an 60 Tagen alten normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren.....	70
Abbildung 38: Biologisches Netzwerk auffällig exprimierter Gene in normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren des Zeitpunktes 40 Tage.	72
Abbildung 39: Biologisches Netzwerk auffällig exprimierter Gene in normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren des Zeitpunktes 50 Tage.	73
Abbildung 40: Biologisches Netzwerk auffällig exprimierter Gene in normoglykämischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Tieren des Zeitpunktes 60 Tage.	74
Abbildung 41: Genexpressionsniveau normoglykämischer LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten.	84

1. Einleitung

1.1. Typ 1 Diabetes mellitus

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) ist eine Erkrankung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass das Immunsystem eine spezifische adaptive Immunantwort gegen körpereigene, betazellspezifische Antigene ausgelöst hat. T1DM ist eine chronische, organspezifische, autoimmune Erkrankung, die durch eine selektive Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas hervorgerufen wird [1]. Als Konsequenz der Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen kommt es zu einem absoluten Insulinmangel welcher nur in Form einer exogenen Substitutionstherapie ausgeglichen werden kann. Im Gegensatz dazu ist der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) eine chronische Glukosestoffwechselstörung bei der kein direkter Insulinmangel besteht. Die Stoffwechselstörung des T2DM zeigt sich in einer eingeschränkten Wirksamkeit des Insulins (Insulinresistenz) und einer gestörten Betazellfunktion (Hyperinsulinismus, Hyper- und Hypoglykämie). In Deutschland beträgt die Prävalenz des T1DM 0,3 % und die Inzidenz liegt mit steigender Tendenz bei 14 von 100.000 Menschen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland von 1989 bis 2003 pro Jahr um ~ 4% anstieg.

Neuerkrankungen von Typ 1 Diabetes (0-14 Jahre pro 100 000 Kinder pro Jahr) 2011

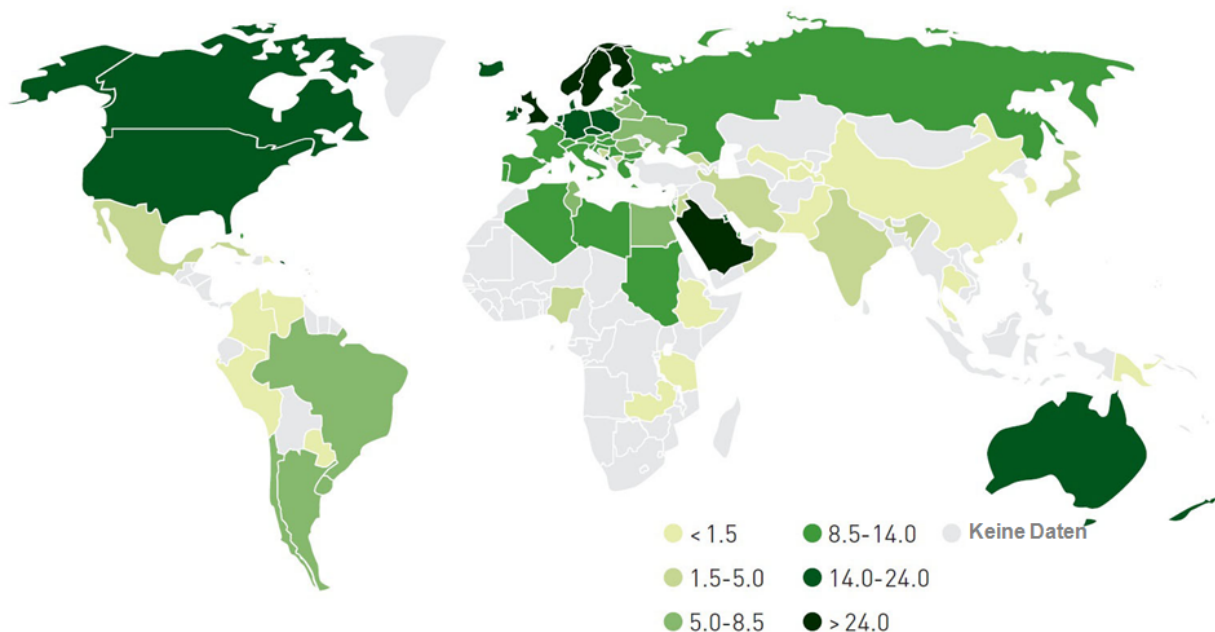


Abbildung 1: International Diabetes Federation (IDF) Atlas zur weltweiten Prävalenz von Typ 1 Diabetes mellitus im Jahr 2011. Darstellung der Neuerkrankungen auf 100.000 Kinder pro Jahr im Alter zwischen 0-14 Jahren. Adaptiert von IDF.

Aufgrund dieser Daten ergab sich folgende Prognose für die kommenden Jahre bis 2020: Schätzt man für das Jahr 2005 ca. 15.000 neue Fälle von T1DM bei Kindern unter 15 Jahren in Europa, gehen die Forscher für das Jahr 2020 von 24.400 neuen Fällen aus [2]. Folglich ist der T1DM eine der häufigsten chronischen Erkrankung im Kindes- und Jugendalter in den westlichen Ländern [1]. Im Altersverlauf konnten bisher keine T1DM Erkrankungen innerhalb der ersten sechs Lebensmonate beobachtet werden. Jedoch erfolgt danach ein kontinuierliches Ansteigen der Inzidenz bis zu einem Alter von fünf bis sieben Jahren. Der Höhepunkt der Inzidenz befindet sich mit beginnender Adoleszenz im Alter von 12 bis 13 Jahren bei Mädchen und ein bis zwei Jahre später bei Jungen [3]. Zusätzlich kann ein nicht unwesentlicher Teil (5-10 %) der Erkrankungen nach dem 40. Lebensjahr, ebenfalls mit autoimmuner Ätiologie aufweisen [4]. Angesichts der übermäßigen Zunahme von T1DM-Erkrankungen steht für die Forschung die Beantwortung der Frage im Vordergrund, welche Faktoren die Entstehung von Inselautoimmunität und T1DM sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Für die Entwicklung von Präventionsmaßnahmen ist die Beantwortung dieser Frage von essentieller Bedeutung [2].

Der T1DM ist charakterisiert durch polygenetische Risikofaktoren mit T-Zell vermittelter Infiltration des Pankreas [5]. Dabei macht die genetische Prädisposition ca. 30% der Suszeptibilität für einen T1DM aus. Verschiedene Regionen des humanen Genoms zeigen eine Verknüpfung mit der Erkrankung. Eine signifikante Assoziation besteht mit den humanen Leukozytenantigen (HLA) Genen, die auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 liegen [6]. Zusätzlich werden Umweltfaktoren wie Nahrungsantigene (Gluten und Kuhmilchbestandteile) und Virusinfektionen (Enteroviren und Coxsackie-Viren) als potentielle Auslöser der Autoimmunität in Betracht gezogen.

1.2. Pathogenese

Der T1DM ist charakterisiert durch den totalen Verlust der Betazellen und die absolute Abhängigkeit von einer Insulintherapie. Normalerweise ist das Ergebnis einer adaptiven Immunreaktion gegen ein Fremdantigen die Beseitigung des Antigens aus dem Körper durch das Immunsystem. Virusinfizierte Zellen werden durch zytotoxische T-Zellen zerstört, während gelöste Antigene von Makrophagen phagozytiert werden. Wenn sich aber eine Immunantwort gegen Autoantigene entwickelt, weil das Immunsystem das Antigen permanent beseitigt, entstehen chronische Entzündungsvorgänge [7]. Die T1DM Erkrankung tritt autoimmunvermittelt und in Bezug auf HLA-Risikoallele, in Form des typischen Kinder- und Jugenddiabetes auf [4].

Bei allen Vertebraten wurde das MHC-System (Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)) nachgewiesen, beim Menschen wird dieser Genabschnitt als HLA bezeichnet. Das HLA-System ist sehr variabel, deshalb existieren für die meisten HLA-Moleküle zahlreiche Varianten, sogenannte Allele. Man geht davon aus, dass die hohe Variabilität des HLA-Systems in Wirbeltieren als Produkt aus bestehendem Selektionsdruck gegenüber Parasiten, selektiver Partnerpräferenz aufgrund genetischer Divergenz und der Vermeidung von Inzucht entstanden ist [8]. Die HLA-Oberflächenmoleküle werden durch eng gekoppelte Gene auf dem menschlichen Chromosom 6 kodiert. Die Hauptaufgabe des HLA besteht darin, den T-Zellen des Immunsystems antigene Strukturen zu präsentieren. Dabei dienen die HLA-Proteine als Leitmoleküle und ermöglichen es den T-Zellen, mit Fremdartigenen zu reagieren [9].

Der gesamte HLA-Genkomplex kann in zwei „klassische“ Gen-Regionen unterteilt werden: Die Region der Klasse I-Gene kodiert für die HLA-Merkmale A, B und C. Zu den Klasse II-Genen gehören die HLA-Merkmale DR, DQ und DP. Das häufige Auftreten von Diabetes bei eineiigen Zwillingen, in Familien und die familiäre Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen zeigt, dass der T1DM erbliche Risikofaktoren hat. Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, dass die HLA-Allele DQB1*03:02 und DQB1*02:01 (die meist mit DR4 und DR3 gekoppelt vorliegen) die wichtigsten erblichen Prädispositionsfaktoren sind. Daher haben Geschwister von Diabetespatienten, bei identischen HLA-Risikoallelen, ein ca. 20 %iges Risiko auch T1DM zu entwickeln. T1DM Patienten weisen zum Großteil HLA-Risikoallele für Diabetes und Antikörper gegen β -Zellproteine auf [10-12]. Die fortschreitende Betazellautoimmunität zeigt sich nach Zerstörung von ~80 % der Betazellen in der typischen Symptomatik.

Innerhalb des Typ-1 Diabetes zeigen die Betroffenen klassische Krankheitssymptome wie eine absolute Insulinabhängigkeit, Hyperglykämie, Polyurie, Polydipsie, Ketonurie und einen rapiden Gewichtsverlust. Der Verlauf des T1DM kann in drei unterschiedliche Phasen unterteilt werden, beginnend bei der genetischen Prädisposition, gefolgt von der Phase der Bildung von Autoantikörpern gegen Inselzellantigene und abschließend die Phase der klinischen Manifestation. Vermutlich beginnt in einem genetisch prädisponierten Patienten (vorhandene HLA-Risikoallele) eine immunvermittelte Zerstörung der Betazellen (Abb. 2) durch einen aus der Umwelt stammenden Auslöser, z.B. in Form einer Virusinfektion (Cocksackie-Virus B, Cytomegalie-Virus) [4, 13, 14]. Umweltfaktoren werden sowohl als Initiatoren oder Beschleuniger des Autoimmunprozesses aber auch als Inhibitoren und Regulatoren angesehen. Man geht davon aus, dass auch der Vorgang der molekularen Mimikry einen Einfluss auf die diabetesassoziierte Autoimmunantwort haben kann. Dabei bestehen nachweislich strukturelle

Homologien zwischen viralen Strukturen und Betazellantigenen, welches die Selektion von autoaggressiven T-Zellen positiv beeinflussen kann [15].

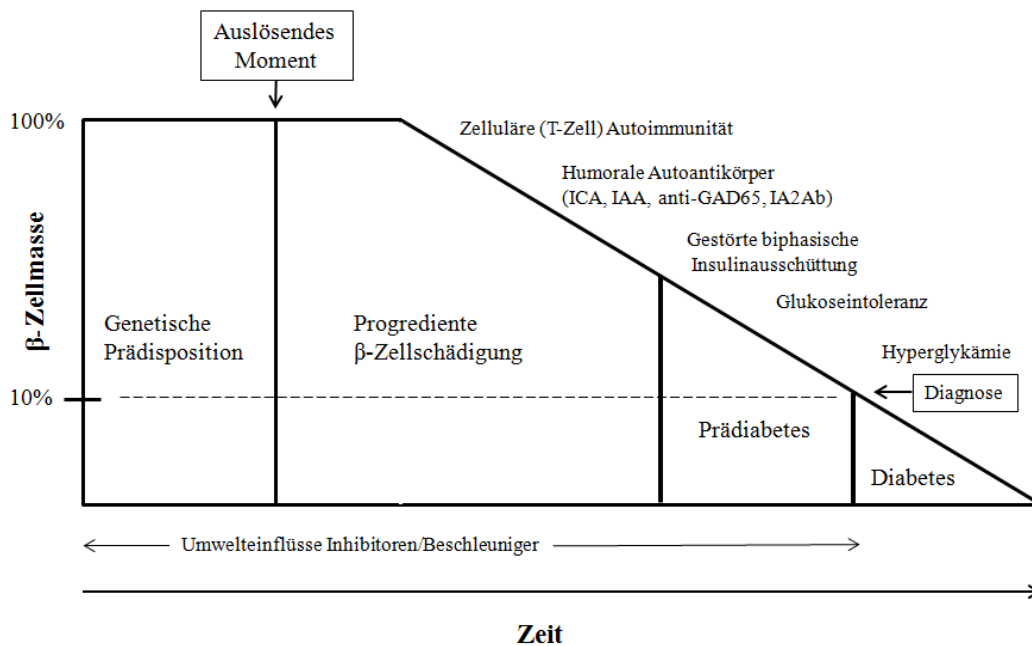


Abbildung 2: Entstehung eines Typ 1 Diabetes mellitus. Das Schema zeigt im zeitlichen Verlauf die Abnahme der Betazellmasse von der genetischen Prädisposition bis zur Diagnosestellung des Diabetes unter beeinflussenden Faktoren und Ereignissen [4].

Einer der verschiedenen möglichen Auslöser bewirkt einen Mechanismus bei dem gereifte autoaggressive T-Zellen aus dem Thymus auswandern und gegen spezifische β-Zellproteine des Pankreas gerichtet sind [16].

Die durch exogene Einflüsse (Viren, Chemikalien, Nahrungsbestandteile, Zytokine) sensibilisierte Betazelle (Abb. 3) setzt in Folge der Zerstörung betazellspezifische Proteine frei, welche durch Antigen-präsentierende Zellen (APZs) aufgenommen, prozessiert und an der Oberfläche präsentiert werden. Eine Antigenpräsentation bewirkt durch APZs mit Hilfe des MHC-II-Rezeptors, eine antigenabhängige Aktivierung von CD-4⁺ T-Zellen. Die aktivierten CD-4⁺ T-Zellen können mittels Ausschüttung von Zytokinen (Typ-1-Helferzellen) oder durch die Aktivierung der B-Lymphozyten (Typ-2-Helferzellen) die zelluläre- oder humorale Immunantwort auslösen [17]. Das aktivierte Immunsystem sezerniert durch aktivierte B-Lymphozyten spezifische Antikörper (Autoantikörper), die gegen betazellspezifischen Proteine (Antigene) gerichtet sind. Maximal 20 Jahre nach dem ersten Auftreten von multiplen Autoantikörpern gegen Betazelloberflächenproteinen im Blut kommt es zur Diabetesmanifestation [18, 19]. Bekannt sind mindestens fünf im Blut nachweisbare Autoantikörper (zytoplasmatischer Inselzell-Antikörper (ICA), Insulin-Autoantikörper (IAA), Glutamat-Decarboxylase-Antikörper

(GADA), Tyrosinphosphatase-IA-2 Antikörper (IA-2A), Zink Transporter 8 Autoantikörper (ZnT8A)), deren prädiktive Bedeutung innerhalb der Ausprägung eines manifesten T1DM diskutiert werden [15]. Die aktivierten Immunzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine, wobei zusätzlich die von APZs präsentierten Antigene durch spezifische T-Helferzellen identifiziert werden (Abb. 03). Die drei klassischen proinflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor-Alpha (TNF- α), Interferon-Gamma (IFN- γ) und Interleukin-1Beta (IL-1 β) sind entscheidend am Autoimmunprozess und der Betazerstörung beteiligt. Zur gleichen Zeit löst der inflammatorische Prozess eine Gegenregulation von antiinflammatorischen Zytokinen, Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10), aus [20, 21]. Währenddessen blockieren IL-4 und IL-10 hauptsächlich die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung von Immunzellen (Monozyten, T-Zellen) [22-24].

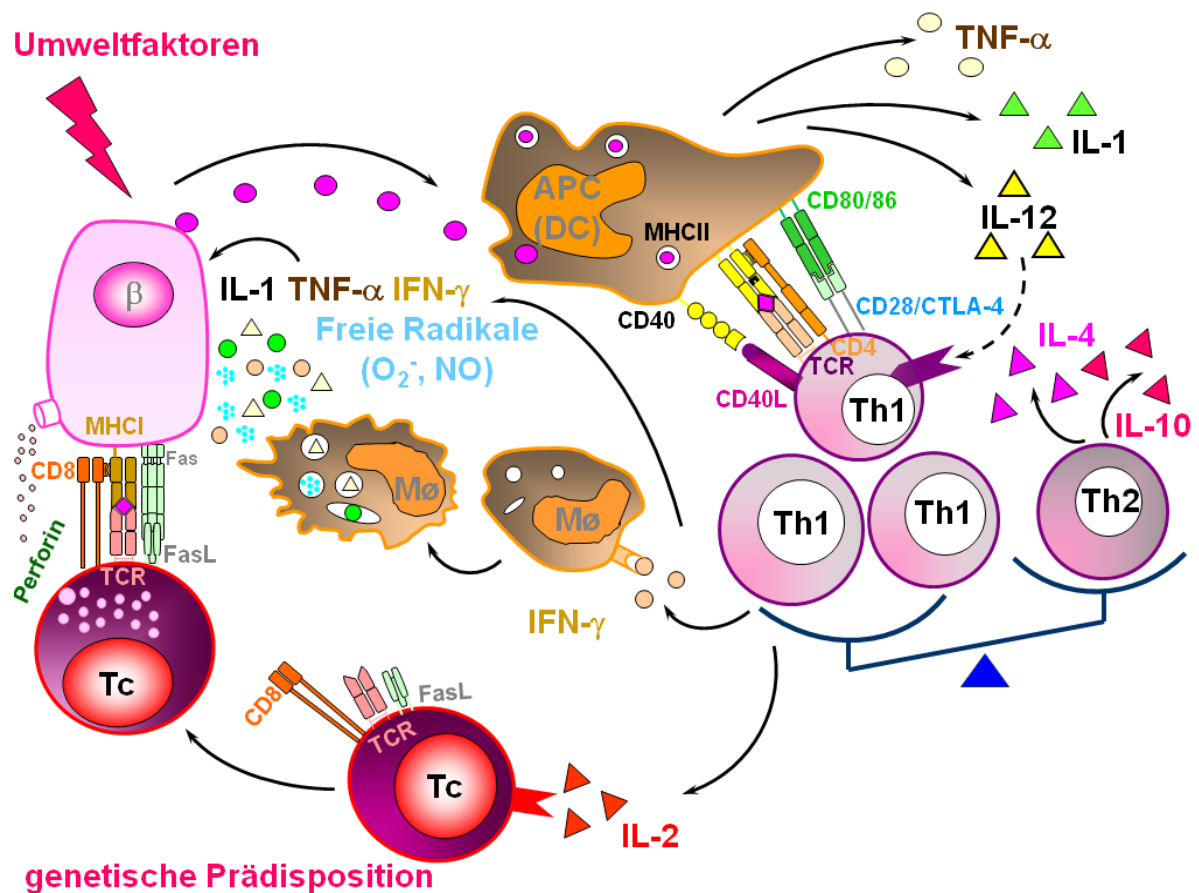


Abbildung 3: Autoimmuner Inflammationsprozess des Typ 1 Diabetes mellitus. Die Darstellung zeigt den autoimmunen Inflammationsprozess, unter Beteiligung der antigenpräsentierenden Zellen (APC), T-Helferzellen (Th1, Th2), Makrophagen (MΦ) und T-Zellen, welche gemeinsam die Zerstörung der β -Zellen bewirken, wodurch der Typ 1 Diabetes mellitus entsteht. Adaption nach C. Gysemans und J. Nerup [25].

Die Aktivierung der T-Helferzellen stimuliert die Sekretion von Zytokinen, wie IFN- γ welches die Expression von MHC-II Molekülen induziert. In Folge kommt es zu einer IFN- γ bedingten

Feedback-Stimulation, die die Sekretion von IL-1 β und TNF- α verstärkt. Das von Th1-Helferzellen sezernierte IFN- γ bewirkt wie in Abb. 3 gekennzeichnet eine Aktivierung der Makrophagen (M Φ), welche zytotoxische freie Radikale wie Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxidanionen (O $_2^-$) freisetzen.

Der eingeleitete Autoimmunprozess setzt sich bis zur Zerstörung aller insulinproduzierenden Zellen fort. Ein Verlust von mehr als 50 % der ursprünglichen Betazellmasse führt zu einer gestörten Insulinsekretion und abnormalen oralen Glukosetoleranztests.

Der Krankheitsbeginn wird oft erst dann diagnostiziert, wenn eine kritische Masse der Betazellen von mehr als 80 % bereits zerstört ist und erhöhte Nüchternblutglukosewerte messbar sind. Als erste Symptome treten häufig Hyperglykämie, Glukosurie (Ausscheiden von Glukose über den Harn) und Ketonurie (Ausscheiden von Ketonkörpern über den Harn) auf. Zum Zeitpunkt der Diagnose kann das C-Peptid, ein Bestandteil des Proinsulins und Parameter der endogenen Insulinsekretion, im Blut weiterhin detektiert werden, welches mit progredienter Betazellzerstörung dann nicht mehr nachweisbar ist [26]. Die Diagnose der vollständigen Betazellzerstörung erfordert eine Substitution von Insulin, um der durch absoluten Insulinmangel auftretenden lebensbedrohenden Ketoazidose entgegen zu wirken.

1.2.1. Tiermodelle des Typ 1 Diabetes mellitus

Versuche an Tiermodellen des T1DM (NOD-Maus, BB-, KDP-, LEW.1AR1-*iddm* Ratte) werden zur Aufklärung von genetischen Ursachen, beeinflussenden Umweltfaktoren und Arznein die zur Prävention oder Intervention der Pathogenese der Inselautoimmunität dienen genutzt. Die Maus (*Mus musculus*) und die Ratte (*Rattus norvegicus*) werden in der Forschung hauptsächlich dazu genutzt, spezifische genetische Defekte, ausgehend von Inzuchtlinien, zu analysieren. Dabei haben Nagetiermodelle den Vorteil der schnellen Reproduktion, einfacher Haltungsbedingungen und die relative Vergleichbarkeit als Säugetier zum Menschen.

1.2.1.1. Das NOD-Mausmodell

Seit 30 Jahren dient die non-obese diabetic (NOD) Maus als Tiermodell zur Erforschung genetischer und pathologischer Grundlagen des T-Zell vermittelten autoimmunen Typ 1 Diabetes mellitus [27]. Der Ursprungsstamm der NOD ist der CTS (Cataract Shionogi) Stamm der Shionogi Research Laboratorien in Japan. Makino und Kollegen entwickelten den NOD-Mausstamm als gezielte Selektion auf einen Katarakt anfälligen Stamm basierend auf dem Auszuchtstamm Jcl:ICR [28]. In der 6. Generation (F6) kam es zur Selektion von Tieren mit hoher Nüchternblutglukose und fehlendem Katarakt. In der 13. Inzuchtgeneration (F13), des auf

hohe Nüchternblutglukose selektierten Stammes (NON/Shi), wurde dann hinsichtlich normaler Nüchternblutglukose selektiert und weiter ingezüchtet. Die 20. Inzuchtgeneration (selektiert auf normale Blutglukosewerte) offenbarte bei einem Tier einen spontanen Typ 1 Diabetes mellitus. Aus den Nachkommen dieses Tieres entstand das heute genutzte NOD-Mausmodell [29].

Die NOD-Maus kann ab der 4. Lebenswoche einen spontanen Diabetes mellitus entwickeln. Im Gegensatz zum Menschen tritt der Diabetes geschlechtsspezifisch mit einer Inzidenz von 60 % bis 80 % bei Weibchen und 20 % bis 30 % bei Männchen auf [28]. Die Ursache der Geschlechtspräferenz ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt. In einer aktuellen Studie geht man davon aus, dass mikrobielle Einflüsse im frühen Lebensalter Auswirkungen auf die Konzentration von Geschlechtshormonen im Organismus haben, was die Entwicklung der Autoimmunität und die Diabetesinzidenz in der NOD-Maus verändert. Im speziellen Fall führte ein erhöhter Gehalt von Testosteron in weiblichen NOD-Mäusen, hervorgerufen mittels Transfer fremder Darmflora, zu einer weniger fulminanten Insulinitis und Autoantikörperproduktion [30].

Histologische Studien an der NOD-Maus haben gezeigt, dass ab der 3. Lebenswoche lymphozytäre Infiltrationen innerhalb der Langerhansschen Inseln des Pankreas beobachtet werden können [28]. Im Alter von 20 Wochen findet sich in den NOD-Mäusen eine benigne Insulinitis, die zu 100 % beider Geschlechter betrifft.

Die Infiltration der Inseln wird durch dendritische Zellen und Makrophagen initiiert. Im zeitlichen Verlauf folgen sowohl CD-4⁺ und CD-8⁺ T-Zellen als auch B-Zellen [31]. Dabei sind die Immunzellen hauptsächlich in der Peripherie der Inseln lokalisiert (Peri-Insulinitis) [32]. Die β -Zellzerstörung in der NOD-Maus wird durch direkte Zytotoxizität (Fas, Perforin/Granzym) oder auf indirektem Weg (proinflammatorische Zytokine, freie Radikale) durch die Leukozyten vermittelt [31]. Insbesondere werden die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β beim Phagozytieren apoptotischer Zellen durch Makrophagen ausgeschüttet [27]. Die lymphozytären Infiltrationen beschränken sich im Gegensatz zum Menschen in den NOD-Mäusen nicht nur auf die Langerhansschen Inseln des Pankreas, sondern lassen sich auch in anderen Geweben wie der Schilddrüse, Speichel- und Tränendrüsen und in seltenen Fällen in der Niere, Muskulatur und neuralem Gewebe nachweisen [29]. Zusätzlich zeigen sich in der prädiabetischen NOD-Maus spezifische Autoantikörper gegen Insulin (anti-Insulin) und gegen die Glutamatdecarboxylase (anti-GAD), jedoch haben experimentelle Transfers der erwähnten Autoantikörper nicht zum Auslösen eines Diabetes im NOD-Mausmodell geführt [28, 31]. Auf der Suche nach spezifischen Antigenen wurde, basierend auf dem NOD-Mausmodell, ein Spaltprodukt des Proteins Chromogranin A (ChgA), vorkommend in den sekretorischen Granula der β -Zellen, identifiziert. *In vitro*-Analysen ergaben, dass ChgA eine spezifische CD-4⁺ T-Zellaktivierung

hervorrufen. Neuere Ergebnisse mit humanen CD-4⁺ T-Zellen von T1DM Patienten konnten die T-Zellaktivität gegenüber ChgA bestätigen [33]. Es wird angenommen, dass spezifische posttranslationale Modifikationen des ChgA-Proteins in den Betazellen des Pankreas ablaufen, die dann die Ursache der Antigenität des ChgA-Proteins bilden [34].

1.2.1.2. Das BB-Rattenmodell

Die existierenden BB-Rattenkolonien sind ursprünglich auf eine Wistar-Ratten Auszucht Kolonie der BioBreeding Laboratorien in Ottawa/Kanada zurückzuführen. Das erste diabetische Tier wurde 1974 mit spontaner Hyperglykämie und Ketoazidose beschrieben. Basierend auf diesem Tier ist die erste BB-Sublinie etabliert worden, die an einem spontanen T1DM erkrankt [35]. Die Diabetesfrequenz konnte durch gezielte Selektion und spezifische Haltungsbedingungen geschlechtsunabhängig auf über 90 % gesteigert werden [36].

Die betroffenen Tiere bildeten die Grundlage für zwei Kolonien, aus denen alle weiteren BB-Rattenmodelle entstanden. Die bestehenden BB-Rattenmodelle lassen sich in diabetessuszeptible (BB-DP) und diabetesresistente (BB-DR) Substämme unterteilen. Aufgrund der in vielen verschiedenen Laboratorien gezüchteten Substämme sind genetisch verwandte jedoch heterogene Tiere entstanden. In einer Studie mit 11 verschiedenen BB-Rattenkolonien anhand von Proteinmarkern 20 verschiedene BB-Sublinien klassifiziert werden. Hieraus resultiert eine hohe genetische Variabilität des BB-Rattenmodells, welches eine Identifizierung der Diabetessuszeptibilitätsloci im Vergleich zu einem syngenen System erschwert [37, 38].

Trotz der Vielzahl der entstandenen Substämme exprimieren alle Tiere den MHC-RT1^u Haplotyp. Die primären Komponenten des Ratten MHC-RT1^u beinhalten zwei Klasse I Loci (A, C) und Klasse II Loci (B, D). Die in der BB-Ratte lokalisierte RT1 B/D Region (*Iddm1*) erscheint als der bedeutendste Locus für die Suszeptibilität zu einem autoimmunen Typ 1 Diabetes mellitus vieler Rattenstämme [32]. Humanstudien zur Aufklärung der genetischen Ursache von Diabetes erbrachten die Erkenntnis, dass auch die humane *IDDM1*-Region (MHC, Chromosom 6) die stärkste Assoziation zur Entstehung von T1DM beinhaltet [39].

Die BB-DP Ratten entwickeln einen spontanen autoimmunen T1DM zwischen dem 50. und 90. Lebensjahr. Im Vergleich zu der BB-DP Ratte besitzt die BB-DR Ratte ähnliche Diabetessuszeptibilitätsbereiche entwickelt aber keinen spontanen Diabetes. Bei den BB-DR Ratten ist es jedoch möglich, einen Diabetes durch Manipulationen des Immunsystems wie die regulatorische T-Zell (T_{reg}) Depletion, Toll-like Rezeptor Ligation oder mittels Virusinfektion (Kilham Rat Virus (KRV)) zu induzieren [32, 40].

Die Diabetesmanifestation in der BB-Ratte ist gekennzeichnet durch Hyperglykämie, Ketonurie, Hypoinsulinämie und einen starken Gewichtsverlust. Zusätzlich weisen Substämme der BB-DP Ratten anti-Parietalzell-Autoantikörper sowie extrapankreatische Infiltrationen immunreaktiver Zellen in den Speicheldrüsen und der Schilddrüse (Thyroiditis) auf [41].

Des Weiteren sind die BB-Ratten durch eine Lymphopenie gekennzeichnet, die sich in einer Reduktion der CD-4⁺ und CD-8⁺ T-Lymphozyten, widerspiegelt. Das Auftreten der Lymphopenie der Ratten ist nicht als Ursache der Autoimmunität beschrieben, jedoch ist dieser immunologische Status der T-Zellen für die Entstehung eines spontanen Diabetes mellitus im BB-DP Rattenmodell erforderlich [42]. Die T-Zell Lymphopenie tritt als Folge spontaner Apoptose der peripheren T-Zellen nach Emigration aus dem Thymus auf [32]. Die Ursache dieser spontanen Apoptose ist eine „frameshift“ Mutation innerhalb des GTPase-Gens (*Gimap5*, *Iddm2*) [4, 43, 56] des endoplasmatischen Retikulums, welche zu mitochondrialen Dysfunktion und der T-Zell spezifischen Apoptose führt [32, 43]. Die in BB-Ratten auftretende Lymphopenie konnte in der NOD-Maus und beim Menschen nicht nachgewiesen werden [41, 44]. Zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation treten mononukleäre Infiltrationen innerhalb der Langerhansschen Inseln und im periinsulären Bereich auf [35]. Erste Infiltrationen (Insulitis) treten zwei bis drei Wochen vor Diabetesmanifestation auf. Im folgenden zeitlichen Verlauf kommt es zur progredienten Zerstörung der Betazellen und mit einsetzender Hyperglykämie sind die übrigen „end-stage“ Inseln klein, deformiert und enthalten nahezu keine Betazellen mehr [44].

1.2.1.3. Das KDP-Rattenmodell

Ursprünglich wurde das Komeda diabetes-prone (KDP) Rattenmodell im Jahr 1983 aus dem Long-Evans Tokushima Lean (LETL) Rattenmodell durch Komeda und Kollegen am Tokushima Research Institute in Japan etabliert [45]. Aus der LETL-Ratte wurden die zwei Substämme KDP und die Komeda non-diabetic (KND) Ratte gezüchtet. Ursprünglich zeigte sich die Diabetesinzidenz mit bis zu 30 % in der LETL-Ratte [45]. Aufgrund der geringen Diabetesinzidenz gingen Komeda und Kollegen von einer genetischen Heterogenität und der damit verbundenen Schwierigkeit zur Erforschung der genetischen Grundlagen des Diabetes mellitus innerhalb des LETL Rattenstammes aus. Durch selektive Inzucht der LETL-Ratte konnte die Inzidenz des Diabetes gesteigert und die Entstehung einer Insulitis bei nicht diabetischen Tieren erreicht werden [46, 47]. Das durch Inzucht entstandene KDP Rattenmodell ist gekennzeichnet durch die Pathogenese eines spontanen autoimmunen Typ 1 Diabetes mellitus. Im Vergleich dazu zeigt sich in der KND-Ratte kein Diabetes. Genetische Analysen

haben ergeben, dass die KDP-Ratte neben der MHC-Region mit *Iddm/kdp1* ein rattenspezifisches *Iddm* Hauptsuszeptibilitäts-gen auf Chromosom 11 (RNO11) besitzt, von dem ausgegangen wird, essentiell für die Entstehung der Insulinitis und des Diabetes zu sein [48]. Weitere genetische Analysen haben ergeben, dass die KDP-Ratte eine nonsense-Mutation innerhalb des Casitas B-Zell Lymphom b (*Cblb*) Gens trägt [49]. *Cblb* ist eine Ubiquitin Ligase, die als negativer Regulator der T-Zellaktivierung auftritt und es wird davon ausgegangen, dass eine Dysregulation von Signalwegen mit *Cblb*-Genbeteiligung möglicherweise mit humanen Autoimmunerkrankungen wie auch dem T1DM in Verbindung steht [49, 50]. Für die KDP-Ratte ergab sich aus dieser Entdeckung für Yokoi und Kollegen die Annahme eines 2-Genmodells, bei dem durch *Cblb* eine abnormale T-Zellaktivierung ausgelöst wird und dann über den MHC eine gewebespezifische Immunantwort gegenüber den β -Zellen des Pankreas erfolgt [49].

Die KDP-Ratte entwickelt einen insulinpflichtigen Diabetes (IDDM) innerhalb einer weit ausgedehnten Altersspanne von 60 und 220 Tagen wobei das Durchschnittsalter bei 100 Tagen für männliche und weibliche Tiere liegt [46]. Im zeitlichen Verlauf steigt die kumulative Häufigkeit des T1DM bis zu einem Alter von 220 Tagen auf 82 % an [47]. Pathologisch spiegelt sich der Diabetes der KDP-Ratten in einer ausgeprägten Hyperglykämie, Polyurie, Polyphagie, Hypoinsulinämie und einem Gewichtsverlust wider. Die histologische Auffälligkeit besteht darin, dass das KDP-Rattenmodell zu 100 % bei diabetischen Tieren eine mittel bis stark ausgeprägte Form der Insulinitis aufweist [48].

Im zeitlichen Verlauf kommt es nach Auftreten der Hyperglykämie und zu Beginn des Diabetes zum Ausbleiben der lymphozytären Infiltrationen innerhalb der Inseln des Pankreas. Weiterhin nachweisbar sind jedoch lymphozytäre Infiltrationen in der Schilddrüse und einer Vielzahl von Geweben wie Submandibulardrüse, Nieren, Nebennieren und Hypophyse der KDP-Ratten [48]. Beide Stämme sowohl die KDP-Ratte als auch die KND Ratte zeigen weder eine Leukopenie noch eine Lymphopenie [46].

1.2.1.4. Das LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell

Das LEW.1AR1/*Ztm-iddm* Rattenmodell entstand 1997 durch eine Spontanmutation in einer MHC-kongeneten Inzuchtkolonie (LEW.1AR1) mit einem definierten MHC Haplotyp (*RT1.A^a B/D^u C^u*) am Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover (*Ztm*) [51]. Die autosomal rezessiv vererbte Mutation bewirkt die Manifestation einer klassischen Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) Symptomatik. Durch eine gezielte Verpaarungsstrategie konnte die Inzidenz des diabetischen Syndroms im LEW.1AR1-*iddm* Tiermodell auf 60 % gesteigert werden [52]. Vergleichende Genanalysen konnten Homologien für Suszeptibilitätsloci des

Diabetes in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte im Vergleich mit murinen und humanen *IDDM* Genen aufzeigen. Diese Analysen zeigten zwei Suszeptibilitätsloci für Diabetes auf Chromosom 1 (RNO1) (*Iddm8*, *Iddm9*) und einen Locus auf Chromosom 20 (RNO20) (*Iddm1*) [52].

Die Entwicklung des T1DM tritt im LEW.1AR1-*iddm* Tiermodell relativ fokussiert zwischen dem 40. und 60. Lebenstag auf, wobei das Durchschnittsalter der Diabetesmanifestation bei 58 ± 2 Tagen liegt und geschlechtsunabhängig als Folge der autoimmunen β -Zellzerstörung des Pankreas auftritt [51]. Die Infiltrationen innerhalb der Langerhansschen Inseln können bei noch normoglykämischen Tieren ab dem 40. Lebenstag beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Überschreiten des 120. Lebensstages bei LEW.1AR1-*iddm* Ratten es nicht mehr zur Ausprägung eines Diabetes kommt [52]. Der progressive Betazellverlust von 60-70 % führt zum Übergang vom normo- in den hyperglykämischen Zustand, wobei hier der Prozess des rapiden Betazellenverlustes (> 90 %) innerhalb einer Woche abläuft [53]. Im Stadium des manifesten Diabetes zeigen sich in den „end-stage“ Inseln keine insulinproduzierenden Betazellen oder immunreaktive Zellen mehr jedoch lassen sich α - und δ -Zellen nachweisen [51]. Klinisch manifestiert sich der Diabetes durch Gewichtsverlust, Hyperglykämie, Glukosurie, Ketonurie, Polyurie, Polydipsie und zeigt sich mit einer hohen Letalität innerhalb der ersten Erkrankungswoche, wenn kein Insulin substituiert wird [51].

Die immunologische Betrachtung des LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodells zeigt, dass sich Makrophagen im frühen Stadium der Inselinfiltration als dominanter Immunzelltyp im peripheren Bereich der Insel befinden. Erst mit fortschreitendem Betazellverlust kommt es zur starken Infiltration des gesamten Inselbereiches durch CD-8⁺ T-Lymphozyten. Folglich treten die Immunzellinfiltrate des Pankreas sowohl innerhalb als auch in der Peripherie der Langerhansschen Inseln auf. Während dieser Phase der progressiven Inselinfiltration werden die Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) durch die an den Langerhansschen Inseln lokalisierten Immunzellen sezerniert. Gleichzeitig werden in den Betazellen die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und die Procaspase 3 exprimiert. Es wird davon ausgegangen, dass diese pathologischen Gegebenheiten zur apoptotischen Betazellzerstörung der LEW.1AR1-*iddm* Ratte führen [53]. Im Vergleich zu anderen Organen weisen Langerhanssche Inseln des Pankreas bei diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten eine Insulitis auf, die sowohl durch Immunzellinfiltrate von B- und T-Lymphozyten (CD-4⁺ und CD-8⁺) als auch von ED1-positive Makrophagen und vereinzelt NK-Zellen begleitet wird [51, 54]. Bei Betrachtung anderer Organsysteme zeigt sich, dass in den am Pankreas lokalisierten drainierenden Lymphknoten der diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten ED1-positive Makrophagen, T-Lymphozyten, einige B-Lymphozyten und NK-Zellen

gleichzeitig präsent sind [54]. Daraus ergibt sich die Annahme, dass der Vorgang der lymphozytären Infiltration des Pankreas ausgehend von den pankreas drainierenden Lymphknoten abläuft [55-57].

Die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate in LEW.1AR1-*iddm* Ratten zeigt vergleichbare Infiltrationsmuster, die auch in diabetischen BB-Ratten und NOD-Mäusen beobachtet wurden, wobei Makrophagen und T-Lymphozyten die dominierenden Zellpopulationen darstellen [54, 58, 59]. Qualitativ entspricht diese Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate den Beschreibungen des Pankreas von humanen Typ 1 Diabetes Patienten [54].

Eine quantitative Analyse der T-Zellpopulationen des peripheren Blutes ergab eine Reduktion der CD-3⁺- und CD-4⁺-T-Zellen in LEW.1AR1-*iddm* Ratten im Vergleich zu nicht diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten [60]. Aufgrund des reduzierten CD-4⁺ T-Zellanteils und der unveränderten CD-8⁺ T-Zellpopulation ist eine reduzierte CD-4⁺/CD-8⁺ T-Zell Ratio festgestellt worden. Reduzierte CD-4⁺/CD-8⁺ T-Zell Ratios, mit Focus auf reduzierte CD-4⁺-T-Zellanteile, werden im Allgemeinen mit einer veränderten Balance zwischen regulatorischen Zellen und Effektorzellen assoziiert, welche einen T1DM im Tiermodell und im Menschen auslösen können. Im Vergleich zu den BB-Ratten ergibt sich aus den analysierten T-Zellpopulationen kein lymphopener Zustand in den LEW.1AR1-*iddm* Ratten [60-62].

Studien an BB-Ratten heben die Bedeutung der CD-4⁺- und CD-8⁺-T-Zellen hervor, da ein lymphopener Zustand (CD-4 und CD-8) in diesem Tiermodell essentiell aber nicht ursächlich für die T1DM Entwicklung ist. Des Weiteren führte ein CD-4⁺ T-Zelltransfer aus einer diabetesresistenten BB-Sublinie zur Verhinderung von T1DM in BB-Ratten [63]. In NOD-Mäusen konnte die Entwicklung eines T1DM durch Transfer von peripheren CD-4⁺ T-Zellen aus prädiabetischen NOD-Tieren verhindert werden.

Aufgrund der Beteiligung von CD-4⁺- und CD-8⁺-T-Zellen bei der Entstehung eines T1DM war das Ziel eines Lymphozytentransfers, das autoaggressive oder regulatorische Potential aus diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten zu übertragen. Im Vergleich zu den anderen Studien stellte sich heraus, dass nur der CD-4⁺ T-Zelltransfer in 50 % der Empfänger (athymische LEW.1AR1 *Whn^{tmu}*-Ratten, diabetes-resistent) zur Entwicklung eines Diabetes führte. Im Vergleich dazu, führte der Transfer von CD-8⁺ T-Zellen aus diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten in prädiabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten zu einer höheren Dichte von regulatorischen T-Zellen (CD-25⁺/FoxP3⁺) in den pankreas-drainierenden Lymphknoten (PLNs). Aufgrund dieser Erkenntnisse und anderer Studien wird angenommen, dass regulatorische T-Zellen einen Einfluss auf die Entwicklung von T1DM besitzen. Zusätzlich zur Akkumulation von regulatorischen T-Zellen wurde eine verstärkte Expression von antiinflammatorischen Zytokinen

(IL-4, IL-10, TGF- β) in den PLNs von LEW.1AR1-*iddm* Ratten beobachtet, die keinen Diabetes mehr entwickelten. Der Transfer der CD-8⁺-T-Zellen war letztendlich mit der Reduktion der Diabetesinzidenz von 60 % auf 20 % assoziiert. Basierend auf diesen gesammelten Daten wird vermutet, dass besonders die CD-4⁺-T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Entstehung eines T1DM, ausgehend von den PLNs, spielen können [55-57, 60].

Zurzeit werden zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen Immunsuppressiva eingesetzt, die gezielt das Gesamte oder einzelne Komponenten des Immunsystems manipulieren. In einer an der LEW.1AR1-*iddm* Ratte durchgeführte Präventionsstudie wurde der immunmodulatorische Wirkstoff Fingolimod (FTY20) genutzt, um eine Manifestation des T1DM zu verhindern und nach Krankheitsbeginn einen Schutz der restlichen Betazellen zu bewirken [64]. Infolge der FTY20 Behandlung ließen sich Immuneinfiltrate und die Betazellapoptose des Pankreas und somit die Ausprägung des Spontandiabetes im LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell verhindern [64].

1.3. Prädiktion und Risikofaktoren des Typ 1 Diabetes mellitus

Das Vorkommen des T1DM betrifft mit steigender Prävalenz die europäischen Staaten und Nordamerika. Für die Erkrankung ergibt sich eine lebenslange ärztliche Betreuung der Patienten. Aus diesem Grund wird der Focus in der Forschung auf den Ursprung des Typ 1 Diabetes mellitus und vor allem auf Risikogruppen hinsichtlich einer wirksamen Prädiktion gelegt [5]. Verschiedene Forschungsgruppen haben in den bekannten Studien DAISY (USA), BABYDIAB (Deutschland) und DIPP (Finnland) Hochrisikogruppen untersucht, um genetische, metabolische und umweltspezifische Risikofaktoren für den T1DM zu identifizieren.

Seit 1989 wurden deutschlandweit in der BABYDIAB-Studie mehr als 1650 Kinder von Eltern mit T1DM über einen Zeitraum von mehr als 20 Jahren beobachtet. Bei 145 Kindern konnten Inselautoantikörper (IAA) nachgewiesen werden, 51 Kinder entwickelten einen T1DM. Die BABYDIAB-Studie zeigte, dass die Präsenz von IAAs ein Merkmal der Autoimmunität sein kann und die Detektion dazu dient, Kinder mit erhöhtem Risiko für eine T1DM-Erkrankung zu identifizieren [65]. Ein neuer prädiktiver Antikörper ist der Zink-Transporter-8-Autoantikörper (ZnT8A), der zu 70 % bei Kindern mit neu entwickeltem T1DM vorkommt. 50 % der Kinder, bei denen der ZnT8 Antikörper nachgewiesen wurde, entwickelten innerhalb von 5 Jahren einen T1DM [2, 5]. Zusätzlich ergab die BABYDIAB-Studie, dass ein Langzeitblutglukosewert (HbA1c) zwischen 5,7 % und 7 % bei Schwangeren mit T1DM das Risiko von Inselautoimmunität beim Kind reduziert und Abweichungen zu erhöhtem Risiko führen [66]. Zusammengefasst ergaben die Studien, dass Autoantikörper, HbA1c, der HLA-DR3/4 DQ8

Genotyp und frühkindliche Glutenexposition einen Einfluss auf die Entwicklung eines T1DM haben jedoch keine eindeutige Prädiktion ermöglichen (Barker *et al.* 2004).

Neuere Studien (TEDDY, BABYDIÄT) zielen darauf ab, Umweltfaktoren genauer zu identifizieren, die dafür verantwortlich sind, dass manche Kinder mit einem erhöhtem genetischen Risiko bereits früh im Leben an T1DM erkranken, andere später oder gar nicht.

Ein seit langer Zeit diskutierter Umweltfaktor, der zum Auslösen der T1DM-Erkrankung führen kann, ist eine Virusinfektion. Es wird angenommen, dass eine Virusinfektion (Rotaviren, Cytomegalievirus, Mumpsvirus, Rötelnvirus, Retroviren) auf direktem Weg zytolytische Effekte auslöst oder einen autoimmunen Prozess gegen die Betazellen induziert. Als Ursache der Autoimmunantwort werden strukturelle Homologien zwischen Betazell- und Virusantigenen (molekulare Mimikry) diskutiert. Eine bedeutende Gattung sind die Enteroviren, die als Teil der Familie der Picornaviren oft in jungen Patienten Infektionen hervorrufen können. Das Coxsackie-Virus-B1 (CBV1) wird aufgrund von T1DM-Patientenstudien als Auslöser der Betazellautoimmunität diskutiert, wobei Infektionen durch die Unterarten CBV3 und CBV6 eine protektive Wirkung auslösen sollen [15].

Eine weitere Rolle spielt die frühkindliche Entwicklung der Darmflora, die durch Nährstoffe beeinflusst wird. Versuche mit transgenen NOD-Mäusen (*MyD88*-knockout) ergaben, dass sich bei den NOD-Mäusen, welche kein angeborenes Immunsystem aufweisen, unter komplett keimfreien Bedingungen eine hohe Inzidenz von T1DM entwickelt. Eine niedrige Inzidenz von T1DM stellte sich bei den transgenen NOD-Mäusen nach einer kommensalen Darmkolonialisierung ein [67]. Weitere Studien an NOD-Mäusen zeigten, dass ein reduziertes Vorkommen von *Clostridium leptum* in der Kolonschleimhaut eine Reduktion von regulatorischen T-Zellen zur Folge hat, die eine Autoimmunantwort begünstigen [68].

1.3.1. Suszeptibilitätsbereiche des Menschen und der LEW.1AR1-*iddm* Ratte

Es ist bekannt, dass die Suszeptibilität für den T1DM erblich ist. Die Manifestation des T1DM wird zu etwa einem Drittel durch die Genetik beeinflusst. Aus diesem Grund liegt die Inzidenz von T1DM bei eineiigen Zwillingen bei 36 %, bei 5 % für Geschwister und bei der kaukasischen Bevölkerung bei 0,4 %. Im Menschen wurden über 20 *IDDM* Gene, in der KDP-Ratte zwei Gene, in der BB-Ratte 10 Gene und in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte drei Loci identifiziert, die mit der Suszeptibilität von T1DM in Verbindung gebracht werden. Wie erwähnt spielt der MHC (HLA) bei den Tiermodellen und beim Menschen eine zentrale Rolle [69]. Beim Menschen befindet sich die genetische Kodierung des HLA-Systems im *IDDM1*-Gen. Die Region kodiert diverse Zelloberflächenantigene, die für die Antigenpräsentation wichtig sind. Dabei werden drei

funktionelle Bereiche für den MHC eingeteilt: MHC Klasse I (endogene Peptidpräsentation für CD-8⁺-T-Zellen), MHC-Klasse II (Antigenpräsentation für CD-4⁺-T-Zellen (*IDDM1*)) und MHC-Klasse III (Plasmaproteine, unspezifische Immunabwehr).

Die Komplexität des MHCs (siehe Punkt 1.1.1.) ist bereits bekannt und zeigt, dass acht humane Gene eine entscheidende Rolle spielen: *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1* auf dem Klasse II Loci; und *HLA-A*, *HLA-B* und *HLA-C* auf dem Klasse I Loci. Die Gene der Hochrisikoklasse HLA-II repräsentieren die stärkste Verbindung zu T1DM (30-50 %) und Individuen mit dem *HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8* Genotyp haben ein ungefähr 20-fach höheres Risiko für T1DM als die allgemeine Bevölkerung [70]. Unter den HLA-Klasse I Genen wurde für *HLA-B39* (Antigenpräsentation für zytotoxische T-Zellen) die stärkste Assoziation für T1DM beschrieben. In der DIPP-Studie zeigte sich für das Gen *HLA-B39* unter den Kindern mit T1DM, dass ein oder mehrere Autoantikörper nachweisbar sind. *HLA-A24* wird mit einem beschleunigten Verlauf der Inselzerstörung und T1DM assoziiert. Im Gegensatz dazu steht das *HLA-A03* Allel bei Kindern mit dem *HLA-DR3/DR4* Genotyp für eine Protektion gegenüber einem raschen Diabetesverlauf bei einem oder mehreren Autoantikörpern [5].

Genomweite Analysen (GWAS) haben über 40 nicht-HLA Polymorphismen identifiziert, die mit T1DM assoziiert werden. Eine Studie zeigte, dass bei vorhandenem *HLA-DR3/4-DQB1*302* Genotyp, Polymorphismen im *UBASH3A*-Gen (Suppressor für T-Zellrezeptorsignalgebung) und *PTPN22*-Gen (Inhibitor der T-Zellaktivierung) eine Assoziation zum T1DM verstärken. Ein weiteres beschriebenes nicht HLA assoziiertes Gen für die Autoimmunität ist das *INS*-Gen des Menschen in der *IDDM2*-Region. Die *IDDM2*-Region hat bei familiärer Häufung von T1DM einen Einfluss von 10 % auf die Suszeptibilität [5].

Für jedes einzelne Gen besteht zwar nur ein geringer Einfluss auf die Suszeptibilität, jedoch ergibt die Kombination der Familiengeschichte, des *HLA-DR3/4-DQB1*302* Gentypts, der Genvarianten *UBASH3A*, *PTPN22* [71] und Insulingen (*INS*) ein 16-fach erhöhtes Risiko für Inselautoimmunität und ein 40-fach erhöhtes Risiko für T1DM [72]. Neue Gene für die eine Assoziation mit T1DM nachgewiesen wurden, sind unter anderem das *IFIH1*-Gen, *MDA5* [71] (Detektion viraler dsRNA) und das Histon-Gen *H3K9Ac* (Methylierungsgrad der DNA) [5].

Die drei Suszeptibilitätsregionen der LEW.1AR1-*iddm* Ratte sind *Iddm1*(*RT1-B^U/D^U*), *Iddm8* (*Nkx2-3*, *Ins1*, *Casp7*) und *Iddm9* (*SOD2*). Der genetische Hintergrund der LEW.1AR1-*iddm* Ratte prägt sich allein in der fokalen Infiltration der insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas aus. Die entscheidende MHC-Suszeptibilität entsteht bei der Expression des RT1-B^U/D^U Haplotyps in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte. Die etablierten Rattenmodelle zeigen phänotypisch eine generalisierte Autoimmunität im Vergleich zu der LEW.1AR1-*iddm* Ratte [48]. Die *Iddm8*

Region umfasst mindestens 133 Gene, von denen 56 beschrieben und die drei Kandidatengene *Nkx2-3* [52] (Homeobox, codiert Transkriptionsfaktoren für B- und T-Zelldifferenzierung) [73], *Ins1* (nur für *Murinae* beschrieben, Insulin1) und *Casp7* [74] (Caspase7, Teil der apoptotischen Signalkaskade) mit T1DM assoziiert werden. Für die Suszeptibilitätsregion *Iddm9* wurde das *SOD2*-Gen identifiziert, das die mitochondriale Superoxiddismutase codiert, die eine essentielle Funktion für den oxidativen Schutz der Betazellen hat. Aufgrund der biologischen Bedeutung von SOD2 besteht die Vermutung, dass Veränderungen im antioxidativen Status der Betazellen ein Auslöser der Infiltration sein kann [75, 76].

1.3.2. Der inflammatorische Prozess des Typ 1 Diabetes mellitus

Der immunologische Prozess in Vertebraten wird durch die körpereigenen Zytokine initiiert. Zytokine sind Proteine des Immunsystems welche die Proliferation, Differenzierung und Funktion von Immunzellen des angeborenen (unspezifischen) und des adaptiven (spezifischen) Immunsystems nach Antigenkontakt regulieren [77, 78]. Unterteilt werden die Zytokine des Immunsystems in Interleukine (regulieren Kommunikation zwischen Makrophagen, T- und B-Lymphozyten), Interferone (Hemmung der Zellteilung, Bildung von MHC-1 Proteinen, Aktivierung von Makrophagen), Chemokine (chemotaktisch wirksame Zytokine) und die TNF-Superfamilie (Aktivierung von Monozyten, Stimulation der Chemokinproduktion) [77, 79, 80].

Die in Typ 1 Diabetes mellitus involvierten Immunzellen sind hauptsächlich T-Zellen und Makrophagen aber auch sekretierte Zytokine und freie Radikale (Stick- und Sauerstoffspezies) haben Einfluss auf die Zerstörung der Betazellen [81]. Zytokine gelten als wichtige Marker des inflammatorischen Prozesses sowohl in Typ 1 als auch im Typ 2 Diabetes [82]. Es wurde festgestellt, dass Menschen, die an einem Typ 1 Diabetes mellitus leiden, auch bei optimalem Blutglukosespiegel ein höheres Niveau an inflammatorischen Markern im Vergleich zu Nichtdiabetikern in ihrem Blut aufweisen [83].

1.3.2.1. Proinflammation: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus

Die allgemeine Funktion entzündungsfördernder Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF) besteht darin, die in den Organismus eingedrungenen Erreger zu bekämpfen, indem Immunzellen zum Entzündungsort wandern, aktiviert und reguliert werden.

Als Entzündungsmediator spielt TNF- α eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Apoptose. Auf zellulärer Ebene aktiviert TNF- α Monozyten und neutrophile Granulozyten,

welche sich chemotaktisch gesteuert zum Entzündungsort bewegen. In einem Versuch zur inflammatorischen Bedeutung von TNF- α wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das über Induktion inselnspezifisch das *TNF- α* -Gen exprimieren konnte. Dabei wurde zeigte sich, dass erhöhte mRNA-Niveaus von TNF- α eine Insulitis bestehend aus Monozyten und Lymphozyten mit späterem Diabetes bei allen Tieren zur Folge hatte. Für den Fall, dass innerhalb der Inselzellen kein TNF- α exprimiert wurde, entwickelten die Tiere auch keine Insulitis oder Diabetes [84].

Ein weiterer wichtiger inflammatorischer Marker, der oft im Zusammenhang mit Diabetes zitiert wird, ist IFN- γ . IFN- γ wird hauptsächlich durch die T-Helferzellen gebildet (Th-1) und aktiviert Makrophagen, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten und beeinflusst den Klassenwechsel in B-Zellen. Eine Null-Mutation (INF- γ -Rezeptor) in der NOD-Maus führte zu einem Ausbleiben der charakteristischen Insulitis und späteren Diabetes [77, 78]. In BB-Ratten konnten signifikant höhere mRNA-Expressionsniveaus für *IFN- γ* in mononukleären Zellen zum Zeitpunkt des akuten Diabetes festgestellt werden [85]. Des Weiteren konnte eine Gen-Expressionsstudie an humanen Inseln (*ex vivo*) die Relevanz von INF- γ bestätigen. Durch externe Zugabe von IFN- γ kam es zur signifikant erhöhten Expression von Chemokinen, die eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen und NK-Zellen an den Inseln bewirkten [86].

Weitere entzündungsrelevante Marker sind Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) welche überwiegend von aktivierten Makrophagen produziert werden und allgemein die Kommunikation zwischen Makrophagen, B- und T-Zellen regulieren.

Die Arbeitsgruppe um Jiang *et al.* konnte mit *in-situ* RT-PCR Analysen in diabetischen BB-Ratten nachweisen, dass die mRNA der proinflammatorischen Zytokine *TNF- α* , *IL-1* und *IL-6* verstärkt an Inseln exprimiert wird [87]. Diese Ergebnisse konnte durch die Arbeitsgruppe um Lenzen *et al.* mit *in-situ* RT-PCR Analysen bestätigt und auf andere Tiermodelle erweitert werden. Daraus ergab sich, dass die mRNA von *IL-1 β* und *TNF- α* in Immunzellinfiltraten diabetischer humaner-, NOD-Maus-, BB-Ratten- und LEW.1AR-*iddm* Ratten Inseln prädominant ist. Zusätzlich wurde auch die mRNA der antiinflammatorischen Zytokine (*IL-4*, *IL-10*) innerhalb der Inseln nachgewiesen [88]. Die gleichen Analysen an LEW.1AR-*iddm* Ratten Inseln zum prädiabetischen Zeitpunkt wiesen die Gene von *IL-1 β* , *TNF- α* und *iNOS* mit verstärkter Genexpression auf [53].

Ein Vergleich der Ergebnisse des Pankreas mit einer im peripheren Blut durchgeführten microArray-Genexpressionsstudie konnte an humanen PBMC`s darlegen, dass vor allem *IL-1 β* [89] und chemotaktisch relevante Gene (e.g. *CCL7* und *CCL2*) [90] in neudiagnostizierten T1DM Patienten überexprimiert werden. Die folgende RT-PCR Expressionsstudie konnte die

zuvor gewonnen Ergebnisse auch mit einzelnen mRNA-Sonden bestätigen [91]. Der Versuchsansatz von Levy *et al.* beinhaltete krankheitsspezifische Transkriptionssignaturen humaner PBMC's von jungen T1DM-Patienten. In diesem Versuch zeigte sich eine höhere Expression von Genen, die verantwortlich sind für die Prozesse von Pro- und Antiinflammation (*IL-1*, *IL-24*) und Chemotaxis (*CXCL-1*, *CXCL-2*, *CXCL-3*). Darauf aufbauende *in-vitro* Analysen des PBMC's und Plasma, aus neu diagnostizierten T1DM Patienten, konnten vorherigen Ergebnisse bestätigen. Die Ergebnisse belegen die Annahme, dass es spezifische Genexpressionssignaturen im peripheren Blut innerhalb eines manifesten Diabetes gibt [92].

Für die proinflammatorischen Zytokine ergab sich, dass TNF- α , IFN- γ und IL-1 β nur in Kombination die aktivierten mononukleären Zellen zur Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen stimuliert (mRNA und Proteinebene) [21]. Unter Kontrolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT-1 wird durch diesen regulatorischen Vorgang die Betazellapoptose ausgelöst [81].

1.3.2.2. Antiinflammation: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus

Zur Einschränkung von Entzündungsvorgängen dienen antiinflammatorische Zytokine die aktivierten Immunzellen wieder zu deaktivieren. Zu den wichtigsten Vertretern gehören Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β).

IL-4 wird von T-Helferzellen (Th2), eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie von dendritischen Zellen sezerniert [93]. Diese fördern die B-Zellproliferation und stimulieren die Sekretion von IL-10 und TGF- β bei spezifischen Makrophagen (M2). Aus einem transgenen NOD-Mausmodell ging hervor, dass eine erhöhte Expression von *IL-4* eine protektive Wirkung gegen Autoimmunität in den Betazellen des Pankreas zur Folge hat [94]. Mi *et al.* konnten bestätigen, dass eine erhöhte Expression von *IL-4* vor einem spontanen Wiederkehren von T1DM in der NOD-Maus schützt [95]. Im Hinblick auf die protektive Wirkung von IL-4 ergab eine Studie an BB-Ratten, dass ein regulatorischer Eingriff in das Immunsystem durch Cyclophosphamid, eine reduzierte Genexpression von *IL-1 β* , *IFN- γ* und *TNF- α* mit einer gleichzeitig erhöhten Expression von *IL-4* in mononukleären Milzzellen bewirkt [96].

IL-10 und der Wachstumsfaktor TGF- β werden durch Makrophagen, regulatorische T-Zellen und dendritische Zellen ausgeschüttet. Im Speziellen unterdrückt IL-10 die Synthese proinflammatorischer Mediatoren in Th1-Zellen und Monozyten/Makrophagen und die Bildung reaktiver Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (NO). Die Bildung von IL-10 erfolgt hauptsächlich in aktivierten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und in

Mastzellen [97]. Eine Studie am Pankreas junger mit Insulin behandelte BB-Ratten ergab niedrige mRNA-Expressionsniveaus für *IFN-γ* und die koregulierten Faktoren *IL-10*, *TGF-β* und *iNOS* im Vergleich zu nicht behandelten BB-Ratten [98].

Der transformierende Wachstumsfaktor β wird von antigen-aktivierten T-Zellen, Makrophagen und Monozyten produziert und greift regulierend in Wachstums- und Differenzierungsprozesse ein. TGF- β verhindert zudem die Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten (T-Helferzellen, cytotoxische Zellen) und Makrophagen, vermindert somit die Inflammationsantwort, insbesondere die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF, IFN- γ und IL-1 [78, 99]. Vergleichende Genexpressionsanalysen ergaben, dass TGF- β einen inhibitorischen Effekt auf autoreaktive T-Zellen ausübt [100].

1.3.2.3. Regulation: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus

CTLA4 (cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4) auch bekannt als CD152 ist als Protein an der Oberfläche von CD-4⁺ T-Zellen lokalisiert und vermittelt ein inhibitorisches Signal an die T-Zellen. Ueda *et al.* stellt die Depletion von regulatorischen T-Zellen in Zusammenhang mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Diabetes, da die Funktion regulatorischer T-Zellen CTLA4 abhängig reguliert wird. Hierfür wurde der Nachweis auf mRNA-Ebene mit verschiedenen Splicevarianten von *CTLA4* gezeigt. Die Expression der *CTLA4* mRNA führte *in vitro* zu einer Inhibierung der T-Zellproliferation, wobei eine Reduktion der *CTLA4* mRNA mit einer verminderten Blockade des CD-80/CD-86 Rezeptors und folglich mit einer verstärkten T-Zellaktivierung einhergeht [101]. Im direkten Zusammenhang mit den regulatorischen T-Zellen steht auch der Transkriptionsregulator FoxP3 (Forkhead-Box-Protein-P3). Dieser wird vermehrt in regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) exprimiert und dient somit als Marker für native und peripher entstandene T_{regs} [102]. FoxP3 entfaltet seine Funktion durch Bindung an spezifische DNA-Bereiche, welches als Regulator die Genexpression beeinflusst. Für *FoxP3* konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Genexpression in den peripheren T-Zellen mit einer suboptimalen T-Zellaktivierung verbunden ist [103]. Eine an BB-Ratten durchgeführte Transferstudie mit aktivierten T-Lymphozyten ergab, dass die Ratten, die zusätzlich T-Zellen (CD-4⁺ CD-25⁺, starke FoxP3-mRNA Expression) appliziert bekamen, vor der schnellen Entwicklung eines Diabetes geschützt werden konnten. Auch konnte bewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von *FoxP3*-mRNA eine Erhöhung der Expression von *CD-25*- und *CTLA-4* auf mRNA und Proteinebene auslöst [104]. Daraus ergibt sich der starke regulatorische Einfluss von FoxP3 auf die T-Zellaktivierung und indirekt auf die Entwicklung von Diabetes [105].

1.3.2.4. Zelloberflächenmarker: Genexpressionsmuster im Typ 1 Diabetes mellitus

Zur Zeit sind verschiedene Oberflächenmarker bekannt, die eine Rolle bei der Entstehung des T1DM spielen. Bei Zelloberflächenmarkern handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, welche oft zellspezifisch exprimiert werden und eine Funktion als Rezeptor oder Signalgeber besitzen.

L-Selektin (CD62L oder Leukozytenselektin) ist ein Adhäsionsmolekül, welches den Kontakt zwischen Zelle (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) und der Gefäßwand vermittelt. Weiterhin spielt L-Selektin eine wichtige Rolle bei der Wanderung von Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten [102]. In einer Humanstudie konnte ein erhöhtes *L-Selektin* mRNA-Niveau in Lymphozyten von Patienten mit diabetischer Retinopathie im Vergleich zu Patienten ohne Retinopathie nachgewiesen werden [106]. Im Allgemeinen konnte für L-Selektin bestätigt werden, dass es nach Aktivierung der T-Zellen und Abspalten der L-Selektin Moleküle zu einer starken Expression des *L-Selektin*-Gens kommt. Der auslösende Mechanismus und die beteiligten Komponenten zur Reexpression von *L-Selektin* sind derzeit noch nicht identifiziert, jedoch zeigt sich mit L-Selektin ein relevanter Oberflächenmarker in der Entwicklung von Diabetes [107].

CD-25 ist ein Transmembranprotein, das als Teil des IL-2 Rezeptors auf aktivierten T-Zellen, aktivierten B-Zellen, Thymozyten, Oligodendrozyten und myeloiden Vorläuferzellen vorkommen. Nach Sakaguchi *et al.* kann die Dysfunktion von regulatorischen T-Zellen (speziell CD-4⁺ CD-25⁺ T-Zellen) die Ursache für den Ausbruch der Autoimmunerkrankung T1DM darstellen [108]. Wie unter 1.3.2.3. erklärt, zeigt sich über eine FoxP3 gesteuerte erhöhte Expression von *CD-25* (mRNA und Protein) ein verstärkt regulatorischer Einfluss auf T-Zellen. Ein Knockdown der FoxP3 Genexpression vermittelte eine geringe Expression von *CD-25* und führte dazu, dass T-Zellen im aktivierten Zustand verblieben. Daraus ergibt sich, dass CD-25 eine Rolle während der Limitierung des inflammatorischen Prozesses spielt.

Neuropilin-1 (NRP-1) ist bekannt als Oberflächenprotein, das eine Verbindung als Korezeptor zu einem Tyrosin-Kinase-Rezeptor eingeht. Neuere Studien konnten belegen, dass NRP-1 auf regulatorischen T-Zellen vorkommt und nicht auf aktivierten T-Zellen oder anderen Immunzellen [109]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion zwischen dendritischen Zellen (DCs) und T-Zellen mittels NRP-1 eine Umlagerung des Zytoskeletts beider Zelltypen bewirkt und somit den Aktivierungsstatus der T-Zellen beeinflusst [110]. Man geht davon aus, dass ein identifizierter Polymorphismus im *NRP-1* Gen einen Einfluss auf die Entwicklung von T1DM in Kindern hat, obwohl *NRP-1* mRNA und -Protein in den Inselzellen des Pankreas nachgewiesen werden konnten [111]. *In vitro* Versuche zeigten, dass eine Zugabe

des regulatorischen Proteins TGF- β eine hohe Expression von *NRP-1* in regulatorischen T-Zellen hervorruft. *In vivo* konnten die *NRP-1* positiven Zellen erst während eines inflammatorischen Prozesses nachgewiesen werden [112]. Aufgrund des Vorkommens auf dendritischen Zellen und der Beteiligung an der Initiation der primären Immunantwort (Kontaktvermittlung zwischen T- und dendritischen Zellen) stellt sich *NRP-1* als relevanter Marker der Immunantwort dar [113].

1.3.3. Entscheidungsbäume als statistische Methode zur Krankheitseinschätzung

Eine statistische Methode zur Krankheitseinschätzung und Entscheidungsfindung ist die Erstellung von Entscheidungsbäumen. Der Ursprung des Verfahrens liegt im Bereich des maschinellen Lernens und wird zur computergesteuerten Analyse biologischer Daten genutzt [114, 115]. Unter dem Begriff des maschinellen Lernens wird die Generierung von Wissen aus Erfahrung zusammengefasst (künstliche Intelligenz). Das künstliche System (Computerprogramm, (WEKA)) lernt aus den eingegebenen Beispielen. Nach Beendigung aller Rechenvorgänge wird die Verallgemeinerung der einzelnen Daten in Gesetzmäßigkeiten (Regeln) präsentiert um zukünftige unbekannte Daten zu beurteilen. Diese Regeln werden auch in einem Entscheidungsbaum der eine automatische Klassifizierung vornimmt, definiert.

Bei Entscheidungsbäumen handelt es sich um hierarchisch verlaufende Bäume die zur Darstellung von spezifischen Entscheidungen genutzt werden. Eine Berechnung der Regeln erfolgt auf Grundlage verschiedener Algorithmen. Die Algorithmen unterscheiden sich hinsichtlich folgender Kriterien: (1) Auswahl der Attribute und Werte der Regeln an den Knoten des Baumes, (2) Zeitpunkt des Abbruch der Baumgenerierung und in (3) mögliche Nachbearbeitungsschritte (Baumoptimierung) [116]. Der am weitesten verbreitete Berechnungsalgorithmus der eingegebenen Daten zur Erstellung von Entscheidungsbäumen ist ID3 und der verbesserte Nachfolger C4.5. Die Erstellung eines Entscheidungsbaumes, auf Basis des ID3-Algorithmus, wurde erstmals 1985 durch Quinlan *et al.* beschrieben [117]. Der C4.5 Algorithmus zeigte beim Vergleich zu anderen „Lernalgorithmen“ eine vorteilhafte Kombination aus Berechnungsgeschwindigkeit und Fehlerrate [117]. Inhaltlich zeigt der genutzte C4.5 Algorithmus im Vergleich zu anderen Algorithmen eine breitere Baumstruktur mit einer beliebigen Anzahl an Verzweigungsmöglichkeiten, da die binäre Regelbeschränkung entfällt. Mit Hilfe des Berechnungsalgorithmus C4.5 wurden bereits Analysen von Genomdaten durchgeführt, zum Beispiel um Beziehungen zwischen Expressionsniveaus verschiedener Gene der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zu erfassen [115].

Zusammengefasst, in der Praxis werden diese Bäume als Methode zur automatisierten Klassifikation von Daten genutzt um eine Lösung für Entscheidungsprobleme zu finden.

Im dargestellten Beispiel (Abb. 4), kann im Bereich der biologischen Analyse von Genexpressionsdaten die Höhe des Genexpressionsniveaus die Entscheidung für die Klassifikation (Kein Diabetes, Diabetes) liefern. Der Entscheidungsbaum (Abb. 4) kann ausgehend von einem Wurzelknoten ($IL-1\beta$) und einer beliebigen Anzahl von inneren Blattknoten ($IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$) gebildet werden. Der daraus entstehende Entscheidungsbaum zeigt, dass jeder Weg von einem Wurzelknoten zu einem Blattknoten des Baumes durch eine logische Regel repräsentiert wird die eine Antwort (weiteres Blatt oder Endpunkt) durch das entsprechende Niveau der Genexpression vorhersagt.

Das Entscheidungsbaumbeispiel (Abb. 4) zeigt einen Entscheidungsbaum für die mögliche Entwicklung eines Diabetes in Abhängigkeit der Genexpression der drei proinflammatorischen Zytokine ($IL-1\beta$, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$).

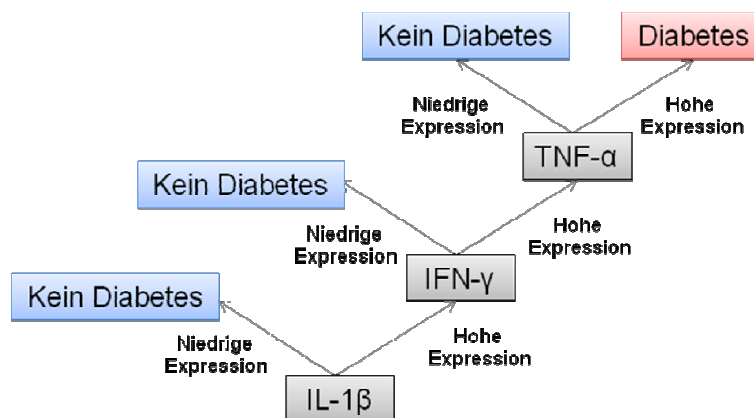


Abbildung 4: Entscheidungsbaumbeispiel für die Prädiktion von Diabetes. Der Baum zeigt, dass in Abhängigkeit von einer hohen Genexpression von $IL-1\beta$, $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ ein Diabetes entwickelt wird.

Der Vorteil von Entscheidungsbäumen im Gegensatz zu anderen Verfahren (neuronales Netzwerk, Support-Vector-Machine) ist die Verständlichkeit des Klassifizierungsverfahrens und die Möglichkeit zur graphischen Darstellung der Ergebnisse. Mit dem System des Entscheidungsbaumes kann ein bestehender Fall leicht klassifiziert werden und die entsprechenden Attribute (Gene; siehe Abb. 4) nachvollzogen werden [118].

In der biologischen Forschung wird das Verfahren des Entscheidungsbaumes bei der Analyse von Genexpressionsdaten zur Identifikation assoziierter Gene durch deren Expressionslevel genutzt [115]. In dieser Studie wurden Beziehungen einzelner Gene, basierend auf microArray-Analysen, zueinander hergestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von hoher- oder niedriger Expression ausgewählter Gene ($SWI5$, $CLN1$ und $CDC28$) das Zielgen ($CLN2$) hoch- oder runterreguliert wird [119]. Das Entscheidungsbaummodell kommt auch in verschiedenen Bereichen wie Stochastik (z.B. Vorhersage von Wahrscheinlichkeiten), Medizin

(z.B. ärztliche Entscheidungsfindung) und Wirtschaft (z.B. Vorhersage der Kreditwürdigkeit) vor

1.4. Prävention des Typ 1 Diabetes

Das grundsätzliche Ziel in der T1DM Forschung ist die Prävention der Erkrankung. Die Schwierigkeit in der Präventionsforschung liegt in der Frage, was es für Kinder und Eltern bedeutet sich mit möglichen Krankheiten auseinanderzusetzen, da zum Beispiel eine genetische Prädisposition nicht zwingend zum T1DM führen muss. Deshalb werden hauptsächlich Interventionsstudien durchgeführt, die in den Prozess der progressiven β -Zellzerstörung während der T1DM Erkrankung eingreifen und zum Erhalt der Betazellfunktion dienen.

Die derzeitigen Studien sind unterteilt in Primärprävention (vor Anzeichen der Autoimmunität), Sekundärprävention (nach Auftreten von Inselautoantikörpern) und Tertiärprävention (bei diagnostiziertem T1DM). Ziel der primären- und sekundären Intervention ist, das Auftreten der Erkrankung aufzuhalten oder zu verzögern. Die Tertiärprävention zielt auf den Erhalt der restlichen Betazellfunktion ab [120].

Die Primärpräventionsstudien beinhalten Ernährungsumstellungen die Kuhmilchprodukte, Muttermilchersatz auf Kuhmilchbasis (enthält Rinderinsulin), Gluten (Bestandteil einiger Getreidearten), Omega-3-Fettsäuren (Fischprodukte) und Vitamin-D (lichtabhängige Synthese in der Haut, natürlich vorkommend in Fettsäuren) betrifft. Dabei wird den Kuhmilchprodukten, dem Rinderinsulin und Gluten eine Erhöhung des T1DM Risikos und den Omega-3-Fettsäuren und Vitamin-D eine protektive Wirkung zugeordnet [120]. Die bedeutendsten Sekundärpräventionsstudien beinhalten Analysen zu den Einflüssen von Nicotinamid, antigenspezifischen Therapien (Insulin, Proinsulin, GAD) und Immunmodulationsexperimente während der Entstehung von T1DM.

Aktuelle immunmodulatorische Humanstudien werden mit Cyclosporin, DiaPep277 [122], anti-CD-20 monoklonaler Antikörper (Rituximab) und dem anti-CD-3 monoklonalen Antikörper (Teplizumab) zur Verhinderung der Progression von T1DM durchgeführt [120].

Cyclosporin hemmt indirekt über die Bindung an Calcineurin die Genexpression verschiedener Zytokine und somit die Aktivierung und Reproduktion von T-Zellen. Abgeschlossene Studien mit Cyclosporin an T1DM Patienten zeigten eine erhöhte Remissionsrate und 50% der Patienten benötigten keine Insulinsubstitution. Ein Nachteil von Cyclosporin sind Nebenwirkungen die aus der erhöhten Kanzerogenität, Nephro-, Gastro- und Hepatotoxizität resultieren und somit ein Risiko für die Therapie an jungen Patienten darstellen [121].

Antikörperbasierende Immunmodulationen werden auch mit dem monoklonalen anti-CD-20 Antikörper (Rituximab) durchgeführt, welcher spezifisch das CD-20-Antigen auf B-Zellen bindet und eine lang andauernde B-Zelldepletion bewirkt. Die Behandlung von neudiagnostizierten T1DM-Patienten mit Rituximab, führte zu einer initialen Verbesserung mit Erhöhung des C-Peptidspiegels, welcher jedoch 3-12 Monate danach wieder absank. Zusätzlich wurde eine Depletion von CD-19⁺-B-Lymphozyten beobachtet. Eine weitere assoziierte Nebenwirkung von Rituximab ist aufgrund der B-Zelldepletion eine hohe Infektionsgefahr durch Viren und Bakterien [121].

Schon abgeschlossene Humanstudien mit dem anti-CD-3 monoklonalen Antikörper Teplizumab erwiesen sich als vielversprechend. Die Behandlung führt zu einer messbaren Reduktion der T-Zellen, wobei der Einfluss auf regulatorische Prozesse noch diskutiert wird [123]. Ein Teil der Patienten mit neu diagnostiziertem T1DM wiesen zwei Jahre nach der Behandlung mit Teplizumab einen höheren C-Peptidspiegel im Blut auf und es wurden geringere Mengen an Insulin substituiert, im Vergleich zu unbehandelte Patienten. Die Einschränkung des Erfolges besteht darin, dass nicht alle Patienten nach einer Teplizumab-Behandlung einen verbesserten Verlauf aufwiesen und eine Behandlung nur zu kurzzeitigem Erfolg führt. Es wird davon ausgegangen das demographische, metabolische und immunologische Eigenschaften der Patienten Einfluss auf die Wirksamkeit der Antikörperbehandlung haben und somit weitere Studien erforderlich sind [124, 125].

Aktuelle Studien untersuchen den anti-CD-4 Antikörper YTS-177.9, dessen Wirkung darin besteht, die CD-4⁺-T-Zell Aktivierung zu inhibieren und eine Toleranz zu induzieren [126]. In Experimenten an NOD-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine CD4-Rezeptorbindung durch den anti-CD-4 Antikörper eine Internalisation des CD-4-Rezeptorkomplexes bewirkt. Diese Internalisation führt zu einer Behinderung des T-Zellrezeptor-Signalweges [127]. Die Behandlung weiblicher NOD-Mäuse führte in 50 % der Tiere zur Remission des T1DM (normale Blutglukosespiegel) innerhalb von 72h für eine Gesamtdauer von 80-120 Tagen. Aus den vielversprechenden Ergebnissen ergibt sich ein relevantes Potential von nicht depletierenden anti-CD-4 Antikörpern für die Behandlung von T1DM [127, 128].

1.5. Zielstellung

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es zur Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas kommt. Die Ursachen sind vielfältig, unter anderem wird der Zusammenhang zwischen Betazellen, antigenpräsentierenden Zellen, autoaggressiven T-Zellen und Umweltfaktoren wie spezifischen Nährstoffen und Virusinfektionen diskutiert. Da der Prozess der Betazellzerstörung ohne äußerliche Symptome verläuft, ist es wichtig eine diagnostische Methode zu etablieren die Anzeichen für eine T1DM Manifestation offenlegt. Um eine mögliche Diabeteserkrankung vorauszusagen fehlen derzeit geeignete Untersuchungsmöglichkeiten, die im Einklang mit ethischen Bedenken invasiver Eingriffe bei T1DM Hochrisikogruppen stehen.

Die vorliegende Doktorarbeit sollte mit der durchgeführten Prädiktionsstudie, klären ob die Möglichkeit besteht im Rahmen einer einfachen Blutentnahme Rückschlüsse auf das Manifestationsrisiko einer Typ 1 Diabeteserkrankung ziehen zu können. Aufgrund der immunologischen Gegebenheiten der LEW.1AR1-*iddm* Ratte, einem Tiermodell des spontanen Autoimmundiabetes mit einem kurzen und definierten Manifestationszeitraum, eignete sich dieses Tiermodell besonders für die prädiktiven Genexpressionsanalyse.

Dafür wurden innerhalb dieser Arbeit die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) der LEW.1AR1-*iddm* Ratte hinsichtlich ihres Potentials als prädiktive Biomarker zu dienen, mittels Genexpressionsanalysen untersucht. Zu diesen Genexpressionanalysen gehörte die Untersuchung von Zytokinen, Chemokinen und weiterer immunrelevanter Gene zu den verschiedenen Stadien der Autoimmunität: prädiabetische Phase (Tag 40-50), progrediente Inselinfiltration (Tag 50-60) und offener Diabetes (ab Tag 60). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer bioinformatischen Generierung von Entscheidungsbäumen (Decision-Tree) analysiert. Abschließend besteht der Nutzen dieser Studie darin, mit minimalem Aufwand, in Form einer Blutprobe, prädiktive Aussagen zum Risiko einer T1DM Erkrankungen treffen zu können.

Veranlasst durch die relative Bedeutung der pankreas-drainierenden Lymphknoten (PLNs) für den Infiltrationsprozess wurde eine Korrelation der prädiktiven Genexpressionsanalysen von PBMCs und PLNs mit den Infiltrationsprozessen des Pankreas angestrebt. Es ist bekannt, dass T-Zellpopulationen einen entscheidenden Effekt auf Autoimmunprozesse ausüben und autoreaktive T-Zellen in der Lage sind, Diabetes zu transferieren.

Daraus ergab sich als weiteres Ziel dieser Arbeit spezifische Veränderungen der Genexpression der PBMCs zu untersuchen, die durch den monoklonalen, modulatorischen anti-CD-4 Antikörper RIB5/2 im LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell induziert wurden. Die Vorarbeiten zeigten, dass die Bindung des RIB5/2 Antikörpers an den CD-4 T-Zellkorezeptor zur Internalisierung des CD4-Antikörperkomplexes führt und somit die T-Zellen behindert. Zusätzlich konnte eine signifikante Reduktion der Diabetesinzidenz während der Phase der Inselinfiltration beobachtet werden. Die Präventionsstudie mit dem modulierenden anti-CD-4 Antikörper RIB5/2 sollte zeigen, inwiefern durch die Suppression der T-Zellaktivierung entscheidende regulierende Marker auf Ebene der Genexpression im LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell existieren und wirken. Aus den zwei erwähnten Hauptzielen der Prädiktions- und Präventionsanalyse ergaben sich für die vorliegende Doktorarbeit folgende zentrale Fragestellungen:

1. Spiegelt sich der zeitliche Verlauf der verschiedenen Stadien der Autoimmunität im Genexpressionsprofil der PBMC wider?
 - 1.1. Wie korreliert das Genexpressionsprofil der PBMC mit dem des Pankreas drainierenden Lymphknotens?
 - 1.2. Ist es möglich, auf Basis der Genexpression, mit dem Entscheidungsbaummodell einzelne relevante Biomarker für den Infiltrationsprozess zu identifizieren?
 - 1.3. Besitzen die Genexpressionsprofile der PBMC einen prädiktiven Wert im Hinblick auf die Diabetesentstehung?
2. Wie ändert sich das Genexpressionsprofil des peripheren Blutes nach einer RIB5/2 Antikörper Intervention im LEW.1AR1-*iddm* Tiermodell?
 - 2.1. Lassen sich die Ergebnisse der Präventionsanalyse in Beziehung zu den Ergebnissen der Genexpression der Prädiktionsanalyse setzen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Liste genutzter Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Aceton	J.T. Baker
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH
Chloroform	J.T. Baker
Cytoseal XYL	Thermo Scientific
Diethylether	J.T. Baker
Diethylpyrocarbonat	Carl Roth GmbH
Eosin	Merck
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol abs. (96 %)	J.T. Baker
Ethanol vergällt (70 %)	J.T. Baker
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Formafix 4 %	J.T. Baker
Glycerol	Sigma Aldrich
Glycogen	Fermentas
Hämatoxylinlösung nach Delafield	Carl Roth GmbH
Histopaque-1077	Sigma Aldrich
Isopropanol	J.T. Baker
Nuklease freies Wasser	Qiagen
PBS 10x	PAA
Oligonukleotide	Fermentas
random Hexamer Primer	BioTez Berlin
RNasin	Promega
Roti-Histol	Carl Roth GmbH
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura
Triton X-100	Sigma Aldrich

2.1.2. Kits

Tabelle 2: Liste genutzter Kits.

Kit	Hersteller
gDNA-free Set	Ambion
PCR-Array Inflammatory Response & Autoimmunity	SABiosciences
peqGold Trifast	PeqLab
Roti-Mount Fluorcare Dapi	Carl Roth GmbH
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Taqman Mastermix	Applied Biosystems

2.1.3. Geräte

Tabelle 3: Liste genutzter Geräte.

Geräte	Hersteller
Advia 2120	Siemens
Blutzucker-Teststreifen	Abbott
Blutzucker-Teststreifen-Messgerät	Freestyle-FreedomLite
Cryostat CM 3050S	Leica
Fluoview FV10i	Olympus
Gradienten-PCR-Cycler	Sensoquest
Injektionskanüle 0,8 x 120mm	Braun
Lichtmikroskop	Zeiss
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Nanodrop-2000	PeqLab
Real Time PCR AB7900	Applied Biosystems
Rotationsmikrotom RM2235	Leica

2.1.4. Puffer und Lösungen

DEPC-PBS

1000 ml *Aqua dest.*

0,1 % (v/v) DEPC

Inkubation über Nacht bei RT, Autoklavieren zur Inaktivierung von DEPC

Eosinlösung

1 g Eosin

200 ml *Aqua dest.*, 2 Tropfen Eisessig (ggf. filtrieren)

Hämatoxylinlösung

30 ml Hämatoxylin nach Delafield
270 ml *Aqua dest.*

2.1.5. Taqman-Sonden

Tabelle 4. Auflistung der verwendeten Taqman-Sonden.

Bezeichnung	Kat.Nr.	Funktion
Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	4352338E	Glukosemetabolismus (interne Kontrolle)
Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)	Rn99999017_m1	Proinflammatorisches Zytokin
Interferon γ (IFN- γ)	Rn99999014_m1	Proinflammatorisches Zytokin
Interleukin 1 β (IL-1 β)	Rn99999009_m1	Proinflammatorisches Zytokin
Interleukin 4 (IL-4)	Rn01456866_m1	Antiinflammatorisches Zytokin
Interleukin 10 (IL-10)	Rn01483989_m1	Antiinflammatorisches Zytokin
L-Selektin (CD-62L)	Rn01483265_m1	T-Zelloberflächenprotein
Cluster of Differentiation 25 (CD-25)	Rn00565865_m1	T-Zelloberflächenprotein
Transforming Growth Factor β (TGF- β)	Rn01475962_m1	Proliferationsregulatorprotein
Neuropilin 1 (NRP-1)	Rn01426691_m1	T-Zelloberflächenprotein
Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3)	Rn01525085_m1	Transkriptionsregulator
Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4, CD152)	Rn01437152_m1	T-Zellterminationssignal

2.1.6. Antikörper

Tabelle 5. Liste genutzter Antikörper.

Antikörper	Kat.Nr.	Hersteller
Anti Maus Alexa Fluor 488	715545151	dianova
Anti Meerschweinchen Alexa Fluor 594	706585148	dianova
Anti Ratte Anti Glucagon	ab10988	Abcam
Anti Ratte Anti Insulin	ab7842	Abcam
Anti Ratte Anti-TCR alpha + TCR beta	ab139367	Abcam

2.1.7. Tiermodelle und Tierhaltung

Das LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell und der dazugehörige LEW.1AR1 Kontrollstamm wurden im Institut für „Experimentelle Chirurgie und zentrale Versuchstierhaltung“ gezüchtet und gehalten. Alle Tierversuche wurden gemäß der Tierversuchsrichtlinien genehmigt und durchgeführt (Akz.: 7221.3-1.1.-055/09). Die Haltung der Tiere erfolgte bei einer Raumtemperatur von 20 ± 2 °C und einem Hell – Dunkelzyklus von jeweils 12 Stunden. Die Tiere erhielten ein kommerzielles, pelletiertes Alleinfuttermittel der Firma ssniff© und Wasser *ad libitum*.

2.2. Methoden

2.2.1. Untersuchungen am LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell

Die Blutglukosekonzentration wurde zweimal die Woche, ab dem 40. Lebensstag mittels der Glukoseoxidasemethode bestimmt. Dazu wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen und mit Blutzucker-Teststreifen/Gerät „Freestyle-Freedom-Lite“ analysiert. Nur normoglykämische Tiere (Blutglukose < 7,8 mmol/l) wurden für die Studie genutzt, wobei Tiere nach Diabetesmanifestation getötet oder weiter verpaart wurden. Innerhalb dieser Studie wurden die Tiere zu den Untersuchungszeitpunkten von 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen mit Hilfe einer CO₂-Narkose getötet. Nach dem Abtöten wurde mittels Herzpunktion das Vollblut entnommen und in EDTA-Röhrchen asserviert. Die Pankreas drainierenden Lymphknoten, das Pankreas und die Milz wurden dem Tier entnommen, gewogen und in *TRIzol* für RNA-Isolation aufbewahrt.

2.2.2. CD4-Immunmodulation durch den monoklonalen Antikörper RIB5/2

Der monoklonale Antikörper RIB5/2 wurde am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock durch Immunisierung von Mäusen mit Hilfe aktivierter T-Zellen generiert. Bei dem mAb RIB5/2 handelt es sich um einen nicht-depletierenden Antikörper. Nicht-depletierende Antikörper führen zu einer geringen Reduktion der Zellzahl (Apoptose). Das Prinzip der Modulation durch den RIB5/2 Antikörpers besteht darin über die Bindung (Abb. 5) des CD-4 T-Zellkorezeptors eine Internalisierung oder „Shedding“ (Abtrennen der Antikörper-Rezeptorkomplexe) des CD4-Antikörperkomplexes zu induzieren. Bleibt die CD-4⁺ T-Zelle erhalten, so ist sie in der Lage zu einem späteren Zeitpunkt erneut den CD-4 Rezeptorkomplex zu exprimieren.

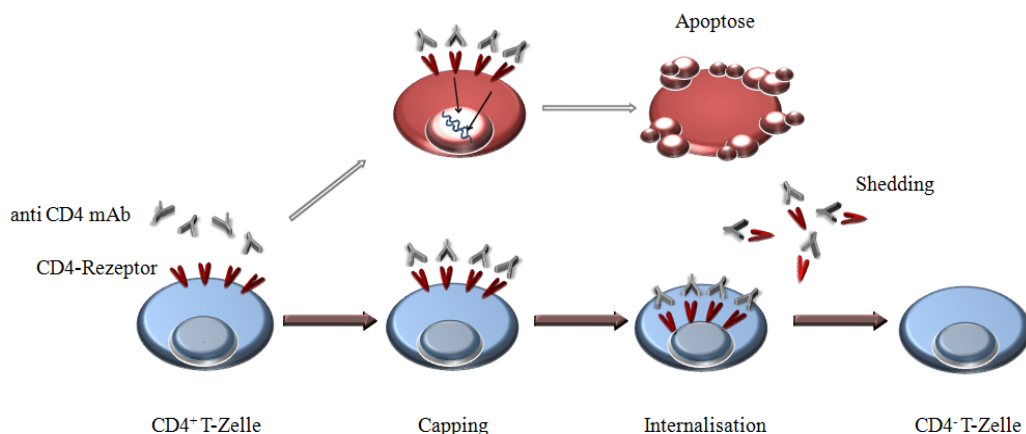


Abbildung 5: Schematische Darstellung des anti CD-4 mAb Wirkmechanismus. Die Bindung (Capping) des anti CD-4 mAb an den CD-4-Rezeptor verursacht die Internalisierung oder Shedding des Antikörper-Rezeptorkomplexes. Bei einer sehr geringen Anzahl der CD-4⁺ T-Zellen wird Apoptose induziert.

Die RIB5/2 Antikörperbehandlung wird genutzt um eine Toleranz gegenüber der Betazellzerstörung innerhalb der kritischen Phase der Inselinfiltration zu induzieren. Für diese Methode wurde den prädiabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten der RIB5/2 Antikörper intraperitoneal (5 x 5 mg Ab/kg b.w.) im Alter von 40 bis 48 Tagen im Abstand von 2 Tagen injiziert. Für RNA-basierende Genexpressionsanalysen wurde den Ratten zu den Zeitpunkten 40, 50 und 60 Tagen maximal 500 µl Vollblut entnommen, die mononukleäre Zellphase gewonnen und RNA isoliert.

2.2.3. Paraffinierung von Organen

Immunfluoreszenzfärbungen für Insulin, Glukagon und den α , β T-Zellrezeptor wurden wie folgt durchgeführt. Bevor eine Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgen konnte, sind die fixierten Organe in Paraffin eingebettet worden. Die Organe wurden direkt nach der Entnahme in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und dann mit 4 %igem Formafixlösung fixiert. Vor Beginn der Paraffinierung wurde die Formafix erneuert und anschließend die einzelnen Organe in eine Kassette eines Einbettautomaten überführt. Zur Entwässerung der Organe folgte dann eine aufsteigende Alkoholreihe (60 %, 80 %, 90 %, absolut Ethanol) mit finalen Eintauchen in Roti-Histol Lösung. Die Organe in den Kassetten, wurden mit flüssigem Paraffin überschichtet und in kleine Plastikkassetten überführt. Nach Aushärten des Paraffins wurden die Gewebeblöcke bei RT gelagert und unmittelbar vor dem Anfertigen der Gewebeschnitte bei -20 °C vorgekühlt.

2.2.4. Haematoxylin und Eosin Färbung (H&E)

Die H&E-Färbung wurden genutzt um mögliche lymphozytäre Infiltrationen in den Inseln des Pankreasgewebes der LEW.1AR1-*iddm* Ratte nachzuweisen. Von den paraffinierten Organen wurden für alle Färbemethoden 1 µm dicke Gewebeschnitte mit dem Rotationsmikrotom angefertigt. Zu Beginn der H&E-Färbung wurden die Objektträger mit den darauf fixierten Gewebeschnitten zur Entparaffinierung zweimal 2 min in einer mit Rotihistol gefüllten Küvette getaucht. Die Objektträger wurden in eine absteigende Ethanolreihe (1x96 %, 1x80 %, 1x60 %) für 5 min überführt. Die Hydratisierung erfolgte für 5 min in *Aqua dest.* Die Schnitte wurden nachfolgend für 30 min in die Haematoxylinlösung getaucht und schließlich für 2 min in lauwarmes Leitungswasser getaucht. Die Eosinfärbung erfolgte im Anschluss für 2 min mit einer nachfolgenden dreiminütigen Spülphase in einer Küvette mit Leitungswasser. Der folgende Ethanolreihe (1x60 %, 1x80 %, 1x96 %, jeweils 1 min) diente der Dehydratisierung der Schnitte bis zur letzten Inkubation in Rotihistol für 5 min. Abschließend wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium (Cytoseal-XYL) und einem Deckgläschen versiegelt.

2.2.5. Immunfluoreszenzfärbung von Insulin und Glukagon

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Insulin und Glukagon wurden 1 µm dicke Paraffinschnitte des Pankreas angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte in mehreren Schritten für jeweils 5 min in Rotihistol, gefolgt von einer Lösung (50 % Rotihistol/50 % abs. Ethanol) und abschließend einem absteigendem Alkoholreihe (95 %, 70 %, 50 %). Nachfolgend wurden die Schnitte dreimal in PBS-Lösung gespült und bei RT für 30 min in einer 2 % BSA/PBS Lösung geblockt worden. Nach Entfernen der Blocklösung wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper für Insulin oder Glukagon in einer 1:200 Verdünnung (2 % BSA in PBS) für 2 h bei 37 °C in einer Inkubationskammer aufbewahrt. Anschließend wurden die Schnitte 3x mit PBS gespült und mit dem Sekundärantikörper für Insulin und Glukagon in einer 1:500 Verdünnung (2 % BSA in PBS) für 1 h bei RT unter Lichtabschluss aufbewahrt. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Die Objektträger wurden trocken getupft und mit Eindeckmedium (Roti-Mount FluorCare) und einem Deckgläschen eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoview-FV10i Fluoreszenzmikroskop.

2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung des T-Zellrezeptors

Für die Immunfluoreszenzfärbung des α , β T-Zellrezeptors von lymphozytären Infiltrationen innerhalb des Pankreas wurden 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Die Schnitte wurde während des Färbeprozesses aufgetaut und dann für 15 min in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend mit PBS gespült. Die gespülten Schnitte wurden bei RT für 30 min mit einer 2 %igen BSA/PBS Lösung geblockt. Anschließend wurde die Blocklösung entfernt und die Schnitte mit dem Primärantikörper mit 1:200 Verdünnung (2 % BSA in PBS) für 2 h bei 37 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Schnitte wurden nachfolgend dreimal mit PBS gespült und mit dem 1:500 (2 % BSA in PBS) verdünntem Sekundärantikörper für 1 h bei RT im dunklen inkubiert. Die Schnitte wurden im Anschluss 3x mit PBS gespült und die Objektträger trocken getupft. Zur Konservierung wurde das Eindeckmedium Roti-Mount FluorCare verwendet. Die Auswertung erfolgte am Fluoview-FV10i Fluoreszenzmikroskop.

2.2.7. Bestimmung der Betazellmasse

Für die Bestimmung der Betazellmasse (in mg) wurden zunächst sechs Paraffinschnitte des Pankreas pro Tier, im Abstand von 200 µm pro Ebene, in insgesamt drei Ebenen angefertigt. Anschließend wurde eine Entparaffinierung der Schnitte und eine Immunfluoreszenzfärbung des Insulins durchgeführt. Am Fluoview-FV10i Fluoreszenzmikroskop wurde die Fläche aller

insulinpositiver Langerhanssche Inseln berechnet. Für die Berechnung der Fläche wurden die Bereiche mit einer Funktion des Computerprogramms FV10-ASW 2.0 vermessen und berechnet. Zur Bestimmung der Betazellmasse wurde das Pankreasgewicht (in mg) mit dem prozentualen Anteil der Betazellfläche multipliziert. Der prozentuale Anteil der Betazellfläche ergab sich aus der Division der Gesamtfläche der Inseln durch die Gesamtfläche des Gewebeschnittes [129].

2.2.8. Automatisierte hämatologische Untersuchung

Das Differentialblutbild bestimmt unter anderem den Anteil der weißen Blutkörperchen wie Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), Lymphozyten und Monozyten des Vollblutes. Nach Abtöten der Untersuchungstiere, zu den Zeitpunkten 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen wurde das Vollblut mittels Herzpunktion entnommen und in EDTA-Röhrchen aufbewahrt. Zuvor wurden die Blutproben und die zur Validierung nötigen Kontrollen mit einem Invertierer bei RT gemischt. Die Blutproben wurden vor der Messung durch Zugabe physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:4 und auf ein Messvolumen von 200 µl verdünnt. Die Messung des Differentialblutbildes erfolgte automatisiert am ADVIA-2120i. Die Quantifizierung wurde über zwei verschiedene Leukozytenmessmethoden ermittelt. Methodisch werden zuerst die Erythrozyten lysiert und mit speziellen Reagenzien (Phthalsäure und HCl) versetzt um im letzten Schritt mit einer Laserdiode bei einer Wellenlänge von 670 nm eine Separierung der Zellkerne und basophilen Granulozyten hinsichtlich der Chromatindichte durchzuführen. Die zweite Messmethode erfolgt im Peroxidase-Messkanal mit Hilfe einer Halogenlichtquelle, wo zuerst die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten gefärbt werden (Chloro-Naphtol und H₂O₂) um unter hydrodynamischer Fokussierung einzelne Zellen quantifizieren zu können. Auf Grund des zellulären Enzymmusters (endogene Peroxidase) und der Zellgröße können die Zellpopulationen von Granulozyten (neutrophilen, eosinophilen, basophilen), Monozyten und Lymphozyten quantifiziert und am Computer in den Maßeinheiten % und Zellen/µl dokumentiert werden.

2.2.9. Isolation mononukleärer Zellen

Für die vergleichenden Genexpressionsanalysen des peripheren Blutes innerhalb des Rattenstammes LEW.1AR1-*iddm* wurde die mononukleäre Zellphase aus dem Vollblut isoliert. Das Vollblut wurde nach dem Abtöten der Tiere mittels Herzpunktion und einer 5 ml Spritze entnommen und in EDTA-Röhrchen überführt um eine Koagulation zu verhindern. Mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation konnte die mononukleäre Zellphase isoliert werden. Hierfür wurde 4 ml DEPC (Reagenz zur Inhibierung von Ribonukleaseaktivität) behandeltes PBS mit

2 ml Vollblut in einem 15 ml Polystyren-Röhrchen gemischt (Abb. 6A). Mit einer 12 cm langen Kanüle wurden 4 ml Histopaque-1077 unter das verdünnte Vollblutgemisch geschichtet (Abb. 6B) und bei 1600 Upm für 30 min bei RT zentrifugiert.

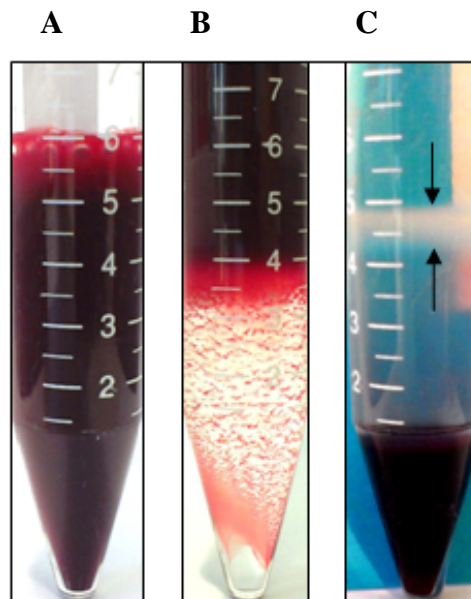


Abbildung 6: Ablauf einer Dichtegradientenzentrifugation im Detail. (A) zeigt das Gemisch aus 1,5 ml Blut und 4 ml DEPC-PBS. (B) zeigt das verdünnte Blut mit 4 ml unterschichtetem Histopaque-1077. (C) zeigt die mit Pfeilen markierte mononukleäre Zellphase nach der Zentrifugation.

Nach der Zentrifugation wurde die oberste Phase mit einer Pipette abgenommen und verworfen (Abb. 6C). Die mononukleäre Zellphase (Abb. 6C, Markierung durch Pfeile) wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mit PBS aufgefüllt. Die Pelletierung der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 4200 Upm für 5 min bei RT. Abschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.10. RNA-Isolation aus mononukleären Zellen

Die Zellpellets wurden für die RNA-Isolation mit 1 ml peqGOLD-TriFast Reagenz durch Pipettieren resuspendiert. Die Proben verblieben zunächst für 5 min bei RT um eine Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je ml peqGOLD-Trifast wurden 0,2 ml Chloroform dazugegeben, die Proben für 15 s kräftig geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei $12000 \times g$ zentrifugiert um eine Phasentrennung zu erlangen. Es bildete sich eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die sich ausschließlich in der wässrigen Phase befindende RNA wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt. Aufgrund der Erwartung geringer Mengen an

RNA, wurden als Carrier für die Präzipitation der RNA 70 µg Glykogen pro 1 ml peqGOLD-TriFast Reagenz dazugegeben. Die Proben wurden gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA für 10 min bei 12000 x g und 4 °C in der Zentrifuge gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol durch Vortexen und Zentrifugation (5 min, 12000 x g, 4 °C) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop2000 bestimmt.

2.2.11. cDNA-Synthese

Die Methode der cDNA-Synthese wurde genutzt um aus isolierter einzelsträngiger RNA mit Hilfe einer DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) eine komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die synthetisierte cDNA wurde für Realtime-PCR Analysen verwendet. Die cDNA-Synthese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 6. Ansatz einer cDNA-Synthese.

cDNA-Synthese Protokoll	Konzentration	Menge (µl)
dNTPs (Mix)	10 mM	8
Hexamerprimer	100 pmol	1,5
DTT	0,1 M	1
First Strand Puffer	5x	5
RNasin	40 U/µl	0,5
Superscript II	200 U/µl	1
RNA	200 ng/µl	1
<i>Aqua dest.</i>	-	7
Gesamtvolumen	-	25

Tabelle 7. Thermocyclerprotokoll einer cDNA-Synthese.

cDNA-Synthese	Temperatur (°C)	Reaktionszeit (min)
Synthese	42	120
Pause	4	∞

2.2.12. Real-Time Taqman PCR Analyse

Die quantitative Real-Time PCR (Polymerasekettenreaktion) wurde genutzt um die synthetisierte cDNA hinsichtlich spezifischer Genexpressionsignale zu untersuchen. Die gemessenen Ct-Werte (Cycle Threshold) wurden gegen ein internes Referenzgen, GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), normalisiert und die relative Quantifizierung des Produktes (Zielgen) erfolgte mit der $\Delta\Delta$ -Ct Methode. Der Real-Time PCR Ansatz erfolgte nach folgendem Protokoll.

Tabelle 8. Protokoll eines Real-Time PCR Ansatzes.

Real-Time PCR Ansatz	Konzentration	Menge (µl)
Taqman Mastermix	2x	10
cDNA-Synthese Ansatz	20x	1
Taqman Sonde	20x	1
<i>Aqua dest.</i>	-	8
Gesamtvolumen	-	20

Der Real-Time PCR Ansatz wurde für jede Sonde im Duplikat in eine 96-Well Platte pipettiert und mit einer optisch adhesiven Folie versiegelt. Die 96-Well Platte wurde dann für 15 s bei 1000 Upm zentrifugiert um vorhandene Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurde die Platte in den ABI-7900HT Real-Time PCR-Cycler gestellt und eine relative Quantifizierung nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 9. Thermocyclerprotokoll für eine Real-Time PCR.

Real-Time PCR	Temperatur (°C)	Reaktionszeit (min)	
Enzym Optimierung	50	2	
Taq- Aktivierung	95	10	
Denaturierung	95	0,25	40
Elongation	60	1	Zyklen

Die Ergebnisse der Real-Time PCR wurden in einer Ausgabedatei (Format *.sds) gespeichert und in dem gerätespezifischen Programm RQ-Manager ausgewertet. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte in Form der Ct-Werte welche mit folgenden Formeln verrechnet wurden.

Tabelle 10. $\Delta\Delta Ct$ -Berechnungsformel für Ausgabe in „Fold-Change“.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{infiltriertes Tier}} - \Delta Ct_{\text{nicht infiltriertes Tier}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tabelle 11. Berechnungsformel für Ausgabe der relativen Genexpressionswerte.

Zielgen (FAM) = 2^{Ct}	Referenzgen (VIC) = 2^{Ct}
Zielgen (FAM) = $1/2^{Ct}$	Referenzgen (VIC) = $1/2^{Ct}$
$(\text{Zielgen (FAM)} / \text{Referenzgen (VIC)}) \times 10^6$	

2.2.13. Rat Inflammatory Response & Autoimmunity PCR-Array

Innerhalb dieses SybrGreen basierenden PCR-Array Systems wurden 88 Gene die an Entzündungs- und Autoimmunitätsprozessen beteiligt sind mittels Real-Time PCR untersucht.

Hierfür wurde die RNA zuerst einer Eliminierung von genomischer DNA nach folgendem Protokoll unterzogen. Die für die genomische DNA-Eliminierung und cDNA-Synthese nötigen Reagenzien waren Bestandteil des erworbenen Kits.

Tabelle 12. Protokoll zum Ansatz zur Eliminierung genomischer DNA.

genomische DNA-Eliminierung	Konzentration	Menge (µl)
RNA	25 ng- 5 µg/10 µl	variabel
GE gDNA Eliminierungspuffer	5x	2
<i>Aqua dest.</i>	-	variabel
Gesamtmenge	-	10

Der pipettierte Ansatz wurde gut durchmischt und kurz zentrifugiert um für 5 min bei 42 °C inkubiert zu werden. Im Anschluss wurde der Ansatz für mindestens 1 min auf Eis gestellt.

Tabelle 13. Protokoll zum Ansatz der cDNA-Synthese.

cDNA Synthese Ansatz	Konzentration	Menge (µl)
BC3 RT Puffer	5x	4
P2 Primer&Externe Kontrolle Mix	-	1
RE3 RT Enzyme Mix	-	2
<i>Aqua dest.</i>	-	3
gDNA Eliminierungs Mix	-	10
Gesamtvolumen	-	20

Der cDNA Synthese Ansatz wurde vorsichtig mit einer Pipette gemischt und für exakt 15 min bei 42 °C in einem Thermoblock inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde der Ansatz für 5 min auf 95 °C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Zu dem 20 µl cDNA Synthese Ansatz wurden 91 µl *Aqua dest.* zugefügt, gut gemischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis inkubiert.

Tabelle 14. Protokoll zum Ansatz der Real-Time PCR.

Real-Time PCR Ansatz	Konzentration	Menge (µl)
SABiosciences RT ² Mix	2x	1350
verdünnter cDNA Mix	26,4x	102
<i>Aqua dest.</i>	-	1248
Gesamtmenge	-	2700

Tabelle 15. Layout des 96er PCR Arrays Rat Inflammatory Response and Autoimmunity.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bcl6	C3	C3ar1	C4b	Ccl1	Ccl11	Ccl12	Ccl17	Ccl19	Ccl2	Ccl20	Ccl21
B	Ccl22	Ccl24	Ccl25	Ccl3	Ccl4	Ccl5	Ccl6	Ccl7	Ccr1	Ccr2	Ccr3	Ccr4
C	Ccr7	Cd14	Cd40	Cd40lg	Cebpb	Crp	Csf1	Cxcl1	Cxcl10	Cxcl11	Cxcl2	Cxcl3
D	Cxcl5	Cxcl9	Cxcr2	Cxcr4	Faslg	Fos	Ifng	Il10	Il10rb	Il17a	Il18	Il1a
E	Il1b	Il1r1	Il1rap	Il1rn	Il22	Il23a	Il23r	Il5	Il6	Il6r	Il7	Il8ra
F	Il9	Itgb2	Kng1	Lta	Ltb	Ly96	Myd88	Nfkb1	Nos2	Nr3c1	Ptgs2	Ripk2
G	Sele	Tirap	Tlr1	Tlr2	Tlr3	Tlr4	Tlr5	Tlr6	Tlr7	Tnf	Tnfsf14	Tollip
H	Actb	B2m	Hprt1	Ldha	Rplp1	RGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tabelle 16. Genbelegung des Rat Inflammatory Response und Autoimmunity Arrays.

Position	Unigene	GeneBank	Symbol	Beschreibung
A01	Rn.20571	NM_001107084	Bcl6	B-cell CLL/lymphoma 6
A02	Rn.11378	NM_016994	C3	Complement component 3
A03	Rn.9772	NM_032060	C3ar1	Complement component 3a receptor 1
A04	Rn.81052	NM_031504	C4b	Complement component 4B
A05	Rn.157282	XM_001067590	Ccl1	Chemokine (C-C motif) ligand 1
A06	Rn.10632	NM_019205	Ccl11	Chemokine (C-C motif) ligand 11
A07	Rn.137780	NM_001105822	Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12
A08	Rn.46679	NM_057151	Ccl17	Chemokine (C-C motif) ligand 17
A09	Rn.12445	NM_001108661	Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
A10	Rn.4772	NM_031530	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A11	Rn.10722	NM_019233	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
A12	Rn.39658	NM_001008513	Ccl21	Chemokine (C-C motif) ligand 21
B01	Rn.48727	NM_057203	Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
B02	Rn.138822	NM_001013045	Ccl24	Chemokine (C-C motif) ligand 24
B03	Rn.140677	NM_001037203	Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25
B04	Rn.10139	NM_013025	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
B05	Rn.37880	NM_053858	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
B06	Rn.8019	NM_031116	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
B07	Rn.7857	NM_001004202	Ccl6	Chemokine (C-C motif) ligand 6
B08	Rn.26815	NM_001007612	Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
B09	Rn.34673	NM_020542	Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
B10	Rn.211983	NM_021866	Ccr2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
B11	Rn.9890	NM_053958	Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3
B12	Rn.81076	NM_133532	Ccr4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
C01	Rn.16815	NM_199489	Ccr7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
C02	Rn.42942	NM_021744	Cd14	CD14 molecule
C03	Rn.25180	NM_134360	Cd40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
C04	Rn.44218	NM_053353	Cd40lg	CD40 ligand
C05	Rn.6479	NM_024125	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
C06	Rn.16463	NM_017096	Crp	C-reactive protein, pentraxin-related
C07	Rn.83632	NM_023981	Csf1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
C08	Rn.10907	NM_030845	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
C09	Rn.10584	NM_139089	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
C10	Rn.13664	NM_182952	Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
C11	Rn.10230	NM_053647	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
C12	Rn.10525	NM_138522	Cxcl3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
D01	Rn.44449	NM_022214	Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
D02	Rn.7391	NM_145672	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
D03	Rn.90347	NM_017183	Cxcr2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
D04	Rn.44431	NM_022205	Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
D05	Rn.9725	NM_012908	Faslg	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
D06	Rn.103750	NM_022197	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
D07	Rn.10795	NM_138880	Ifng	Interferon gamma
D08	Rn.9868	NM_012854	Il10	Interleukin 10
D09	Rn.22261	NM_001107111	Il10rb	Interleukin 10 receptor, beta
D10	Rn.218513	NM_001106897	Il17a	Interleukin 17A
D11	Rn.11118	NM_019165	Il18	Interleukin 18
D12	Rn.12300	NM_017019	Il1a	Interleukin 1 alpha
E01	Rn.9869	NM_031512	Il1b	Interleukin 1 beta
E02	Rn.9758	NM_013123	Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I
E03	Rn.10511	NM_012968	Il1rap	Interleukin 1 receptor accessory protein
E04	Rn.162640	NM_022194	Il1rn	Interleukin 1 receptor antagonist
E05	Rn.195879	XM_576228	Il22	Interleukin 22
E06	Rn.81073	NM_130410	Il23a	Interleukin 23, alpha subunit p19
E07	Rn.134349	XM_001072576	Il23r	Interleukin 23 receptor

E08	Rn.44227	NM_021834	Il5	Interleukin 5
E09	Rn.9873	NM_012589	Il6	Interleukin 6
E10	Rn.1716	NM_017020	Il6r	Interleukin 6 receptor
E11	Rn.10793	NM_013110	Il7	Interleukin 7
E12	Rn.138115	NM_019310	Il8ra	Interleukin 8 receptor, alpha
F01	Rn.92374	NM_001105747	Il9	Interleukin 9
F02	Rn.42962	NM_001037780	Itgb2	Integrin, beta 2
F03	Rn.128333	NM_012696	Kng1	Kininogen 1
F04	Rn.160577	NM_080769	Lta	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
F05	Rn.203016	NM_212507	Ltb	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
F06	Rn.141496	NM_001024279	Ly96	Lymphocyte antigen 96
F07	Rn.37341	NM_198130	Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
F08	Rn.2411	XM_342346	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in BC1
F09	Rn.10400	NM_012611	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible
F10	Rn.90070	NM_012576	Nr3c1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
F11	Rn.44369	NM_017232	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
F12	Rn.102179	XM_342810	Ripk2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
G01	Rn.10359	NM_138879	Sele	Selectin E
G02	N/A	XM_001055833	Tirap	Toll-interleukin1 receptor (TIR) domain-containing adaptor prot.
G03	Rn.107212	NM_001172120	Tlr1	Toll-like receptor 1
G04	Rn.46387	NM_198769	Tlr2	Toll-like receptor 2
G05	Rn.15273	NM_198791	Tlr3	Toll-like receptor 3
G06	Rn.14534	NM_019178	Tlr4	Toll-like receptor 4
G07	Rn.198962	NM_001145828	Tlr5	Toll-like receptor 5
G08	Rn.163249	NM_207604	Tlr6	Toll-like receptor 6
G09	Rn.219862	NM_001097582	Tlr7	Toll-like receptor 7
G10	Rn.2275	NM_012675	Tnf	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
G11	N/A	XM_236794	Tnfsf14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
G12	Rn.137040	NM_001109668	Tollip	Toll interacting protein
H01	Rn.94978	NM_031144	Actb	Actin, beta
H02	Rn.1868	NM_012512	B2m	Beta-2 microglobulin
H03	Rn.47	NM_012583	Hprt1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H04	Rn.107896	NM_017025	Ldha	Lactate dehydrogenase A
H05	Rn.973	NM_001007604	Rplp1	Ribosomal protein, large, P1
H06	N/A	U26919	RGDC	Rat Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Die mit Sonden vorpipettierte 96-Well Platte (Tabelle 15, 16) wurde mit 25 µl des Real-Time PCR Ansatzes befüllt und mit einer optisch adhesiven Folie verschlossen und kurz für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die Platte wurde anschließend in den ABI-7900HT Real-Time Cycler gestellt und das Thermocyclerprotokoll aus Tabelle 9. durchgeführt. Zusätzlich wurden Schmelzpunktkurven aufgezeichnet um für das SybrGreen-System eine qualitative Absicherung des PCR-Produktes zu gewährleisten. Die qualitative Validierung des PCR-Produktes erfolgte über Schmelzkurvenkontrollen. Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe einer Onlinesoftware der Firma Qiagen nach der $\Delta\Delta$ -Ct Kalkulierungsmethode durchgeführt.

2.2.14. Statistische Auswertung der Daten

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte über die $\Delta\Delta$ -Ct Kalkulierungsmethode bei der die über den Taqman ausgegebenen Ct-Werte die Berechnungsgrundlage bildeten. Die Auswertung der relativen Genexpressionsergebnisse wurde im Statistikprogramm GraphPad-Prism 5.0 durchgeführt. Mit Hilfe dieses Programmes konnten der Mittelwert (MW), Standardfehler (SEM) berechnet und eine graphische Auswertung durchgeführt werden. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des t-Tests (Student-t-Verteilung) bei der zu jedem einzelnen Zeitpunkt zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Im Falle mehrerer Vergleichsgruppen (mindestens drei) wurde der statistische Test „one-way“ ANOVA (Varianzanalyse) mit Bonferroni post-Test durchgeführt um einen Nachweis signifikanter Unterschiede zu führen. Der Signifikanzwert (P-Wert) wurde innerhalb der Diagramme in den Stufen * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$) angegeben.

2.2.15. Decision-Tree Analyse

Innerhalb dieser Studie wurde basierend auf den Daten der relativen Genexpressionsanalyse die Decision-Tree (Entscheidungsbaum) Analyse durchgeführt. Die Decision-Tree Analyse diente der statistischen Auswertung um eine Aussage hinsichtlich relevanter Biomarker für die Prädiktion des Infiltrationsprozesses des Pankreas treffen zu können. Mit Hilfe eines Decision-Trees ist es möglich aus einem baumartigen Model die entsprechenden Entscheidungswege aufgrund von Abhängigkeiten abzuleiten. Die durch den Decision-Tree durchgeführte Klassifizierung basiert auf einer Auswahl von verschiedenen Attributen (Gene). Jeder Knoten eines Baumes beinhaltet einen Test auf den Wert seines Attributes (Expression des Gens), die Verbindung zeigt den abhängigen Wert für eine Entscheidung (Höhe der Expression) und ein Blatt am Ende charakterisiert das finale Ziel (Infiltration (Diabetes), Kein Diabetes). Der Berechnungsalgorithmus C4.5, für die Erstellung der Entscheidungsbäume, bildete die Grundlage für die genutzte Auswertung im WEKA Computerprogramm. Die Daten der WEKA-Analyse wurden abschließend in einem Grafikprogramm zur Veranschaulichung in Entscheidungsbäumen visualisiert [130, 131].

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung von infiltrierten und nicht infiltrierten Tieren

3.1.1. Haematoxylin und Eosin Färbung (H&E) des Pankreas

Die Haematoxylin- und Eosinfärbungen des Pankreas von LEW.1AR1-*iddm* Ratten ergaben zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, lymphozytäre Infiltrationen innerhalb des Pankreas. Die auftretenden lymphozytären Infiltrationen zeigten sich sowohl im exokrinen Bereich als auch in den Langerhansschen Inseln des Pankreas. In der Abbildung 7 wurden Tiere ohne lymphozytäre Infiltrationen (A, B) und Tiere mit auftretenden lymphozytären Pankreasinfiltrationen (C, D), zur genaueren Dokumentation in unterschiedlichen Vergrößerungen gegenübergestellt.

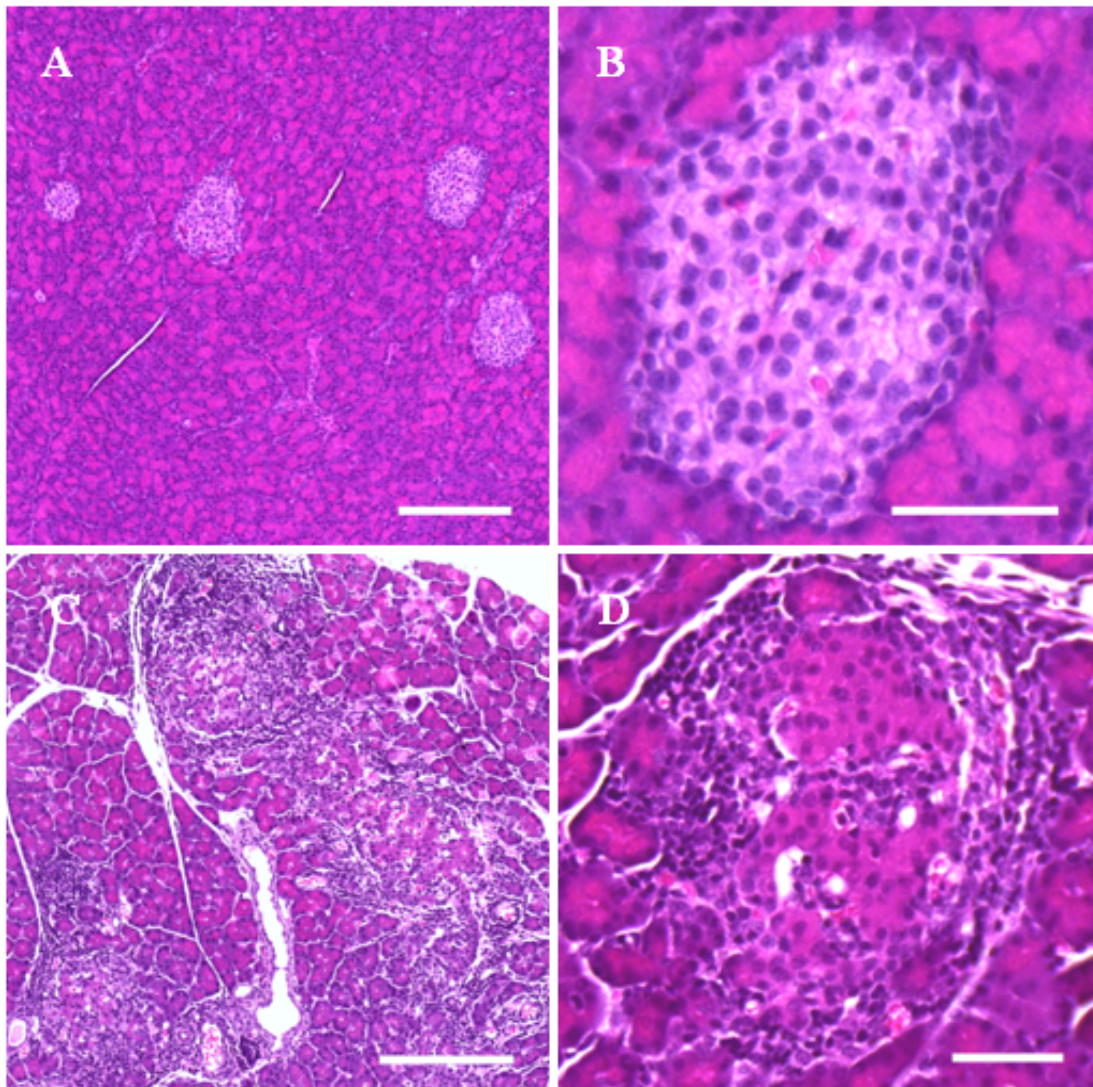


Abbildung 7: Infiltration des endokrinen Pankreas von LEW.1AR1-*iddm* Ratten mit mononukleären Immunzellen. (A, B) normoglykämische LEW.1AR1-*iddm* Ratte, Tag 40 ohne Infiltration. (C, D) normoglykämische LEW.1AR1-*iddm* Ratte, Tag 40 mit Infiltrationen. Gewebeschnitte des Pankreas (A, C Maßstab 200 µm; B, D Maßstab 50 µm) wurden zur Darstellung der Infiltration mit Haematoxylin und Eosin gefärbt.

3.1.2. Langerhanssche Inseln der LEW.1AR1-*iddm* Ratte

Die Insulin-Immunfluoreszenzfärbungen der Langerhansschen Inseln des Pankreas von infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Ratten zeigten im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren strukturelle Unterschiede. Die nicht infiltrierten Tiere wiesen rundlich geformte Inseln (Abb. 8A) im Gegensatz zu den Inseln der infiltrierten Tiere deren Struktur stark verändert und keinen Verbund mehr aufwies (Abb. 8B). Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Insulin und Glukagon zeigte, das Inseln von nicht infiltrierten Tieren (Abb. 8C) eine homogene Form aufwies im Vergleich zu der inhomogenen Struktur der Inseln infiltrierter Tiere (Abb. 8D).

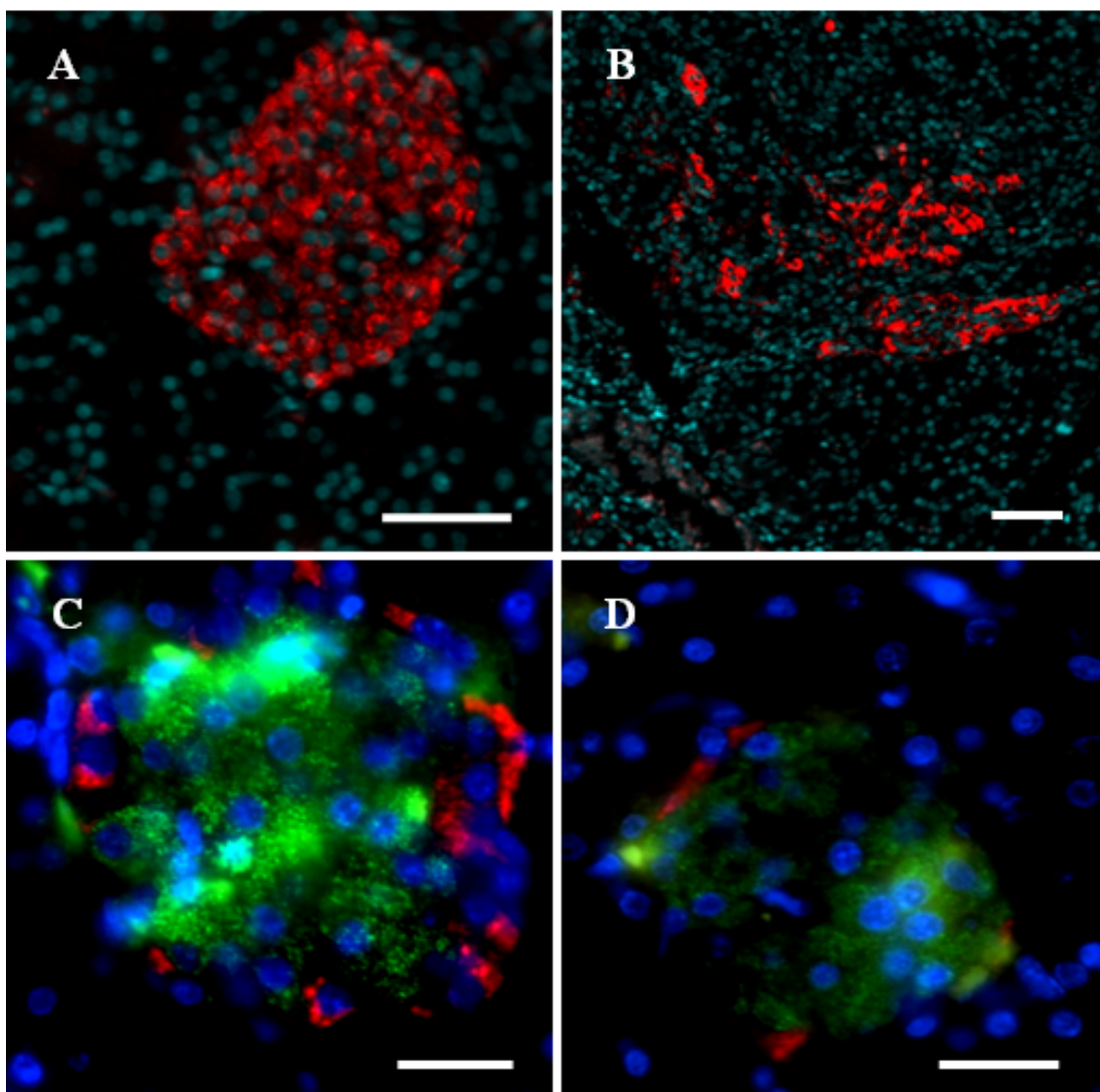


Abbildung 8: Infiltration von insulin- und glukagonpositiven Zellen des endokrinen Pankreas normoglylämischer LEW.1AR1-*iddm* Ratten im Alter von 40 Tagen durch mononukleäre Zellinfiltrate. (A, B) insulinpositive Zellen (rot) einer nichtinfiltrierten Insel (A) im Vergleich zu einer infiltrierte Insel (B). (C, D) insulinpositive Zellen (grün) in Kombination mit glukagonpositiven Zellen (rot) einer nichtinfiltrierten Insel (C) und einer infiltrierte Insel (D), (A, B Maßstab 50 μm ; C, D Maßstab 20 μm).

3.1.3. Immunzellinfiltrationen

Die Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich des α , β -T-Zellrezeptors bei LEW.1AR1-*iddm* Tieren zeigte unterschiedlich stark infiltrierte Regionen innerhalb des Pankreas (Abb. 9A). Die Vergrößerung (Abb. 9B) zeigte Akkumulationen der T-Zellen in einem fokussierten Areal. Eine weitere Vergrößerung des Bereiches zeigte deutlich, dass es sich bei den Infiltrationen um positiv gefärbte T-Zellen handelt (Abb. 9C) die in nicht infiltrierten Tieren nicht nachgewiesen werden konnten.

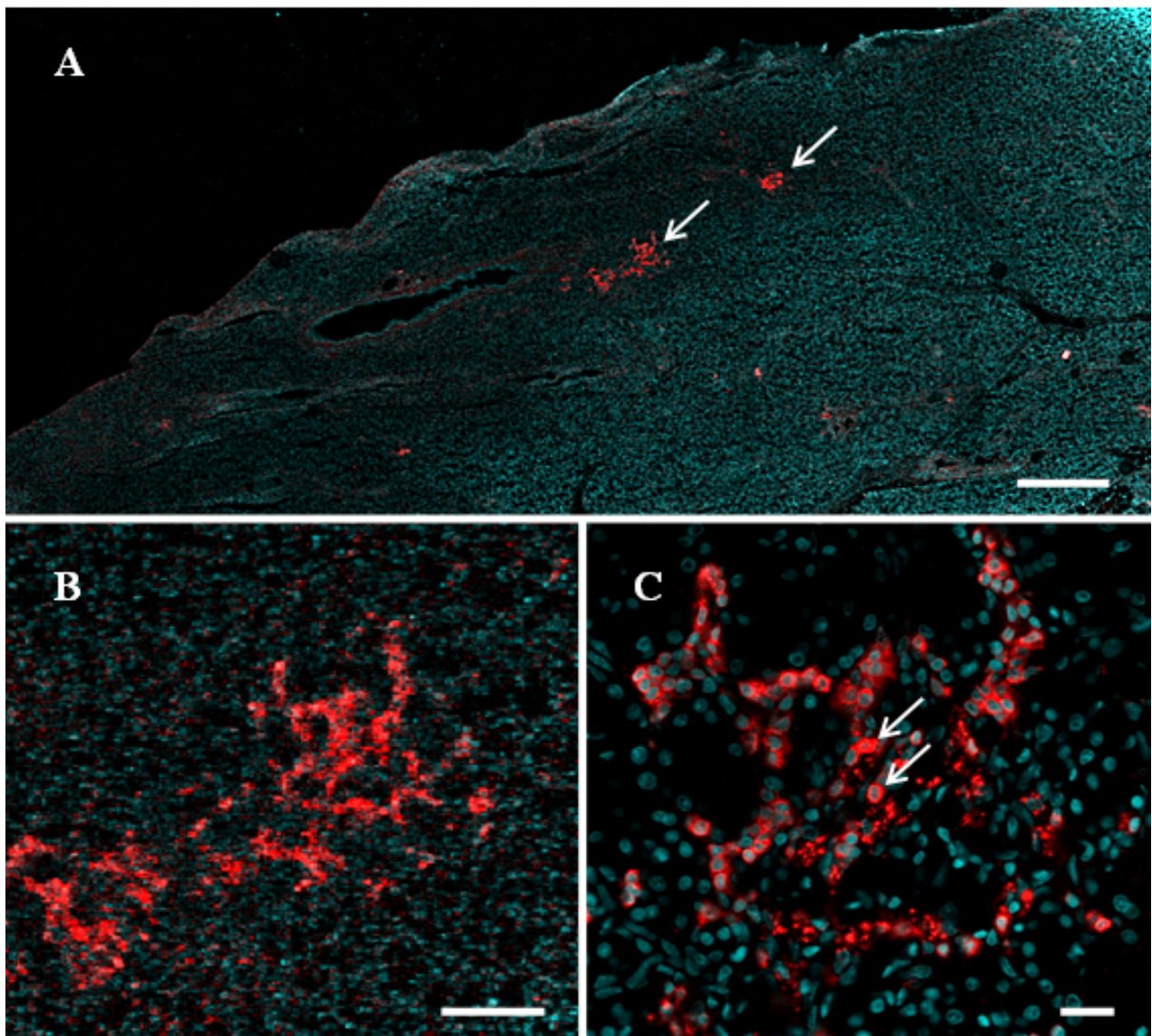


Abbildung 9: Infiltration der Pankreasinseln durch T-Lymphozyten. (A) Pankreasschnitt einer normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratte an Tag 40 (Maßstab, 500 μ m). (B) fokussierte Darstellung des durch den linken Pfeil markierten Bereiches in (A) (Maßstab, 100 μ m). (C) Markierte T-Zellen des ursprünglich hervorgehobenen Areals (Maßstab, 20 μ m). Der Nachweis der T-Zellen erfolgte durch fluoreszenzmarkierte Antikörper die gegen den α , β - T-Zellrezeptor (rot) der T-Zellen gerichtet war.

3.2. Rate der Infiltrationen

Aus der Klassifizierung von infiltrierte und nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tieren (Abb. 10) zu den Zeitpunkten von 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen ergab sich eine unterschiedliche Anzahl von Tieren. Die Untersuchung ergab zum Zeitpunkt 40 Tage, dass 31 % der 35 untersuchten Tiere lymphozytäre Infiltrationen innerhalb des Pankreas und der Langerhansschen Inseln aufwiesen. Zum Zeitpunkt 45 Tage konnte eine niedrige Infiltrationsrate von 18 % bei insgesamt 22 untersuchten Tieren gezeigt werden. Zum Zeitpunkt 50 Tage konnte eine Infiltrationsrate von 38 % bei 16 Tieren nachgewiesen werden. Eine erhöhte Infiltrationsrate von 66 % zeigte sich bei 15 getesteten Tieren zum Zeitpunkt 55 Tage. Der Zeitpunkt 60 Tage war gekennzeichnet durch eine ausgeglichene Infiltrationsrate von 52 % bei 23 untersuchten Tieren. Zu allen Untersuchungszeitpunkten waren sowohl die infiltrierte als auch die nicht infiltrierte Tiere normoglykämisch (Blutglukosewert < 7,8) und somit ohne manifesten T1DM.

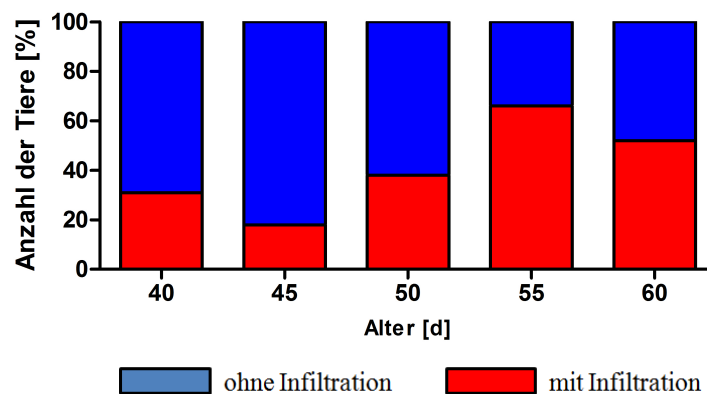


Abbildung 10: Altersabhängige Infiltration des endokrinen Pankreas in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Darstellung des prozentualen Anteils der LEW.1AR1-*iddm* Tiere mit Infiltrationen (rot), 40 (n=35), 45 (n=22), 50 (n=16), 55 (n=15) und 60 (n=13) Tage nach Geburt im Vergleich zu nicht infiltrierte Tieren (blau). In diesem Versuchsaufbau wurden n= 111 normoglykämische Tiere (68 ohne Infiltration, 43 mit Infiltration) analysiert.

3.3. Differentialblutbild infiltrierter und nicht infiltrierter Ratten

3.3.1. Monozyten und Lymphozyten

Im Differentialblutbild wurden infiltrierte und nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere untereinander und mit dem LEW.1AR1 Kontrollstamm verglichen. Es ergab sich zum Zeitpunkt 40 Tage ein signifikant höherer Anteil von Monozyten (Abb. 11A) in infiltrierte Tieren ($0,06 \times 10^3 \pm 0,01 \times 10^3$ Zellen/ μ l) im Vergleich zu nicht infiltrierte Tieren ($0,03 \times 10^3 \pm 0,01 \times 10^3$ Zellen/ μ l). Im weiteren zeitlichen Verlauf ergaben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede für die Messungen des Monozytengehaltes. Der Lymphozytengehalt (Abb. 11B) zum Zeitpunkt 40 Tage im LEW.1AR1 Kontrolltierstamm ($7,56 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$ Zellen/ μ l) war

signifikant höher verglichen mit den nicht infiltrierte Tieren ($4,53 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$ Zellen/ μ l) und infiltrierte Tieren ($4,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$ Zellen/ μ l). Zum Zeitpunkt Tag 50 ergab sich ein signifikant höherer Anteil von Lymphozyten im LEW.1AR1 Kontrolltierstamm ($7,35 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$ Zellen/ μ l) im Vergleich zu nicht infiltrierte Tieren ($4,77 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$ Zellen/ μ l) und infiltrierte Tieren ($5,15 \times 10^3 \pm 0,6 \times 10^3$ Zellen/ μ l). Tag 60 war gekennzeichnet durch einen signifikant höheren Anteil von Lymphozyten im LEW.1AR1 Kontrolltierstamm ($8,59 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$ Zellen/ μ l) im Vergleich zu infiltrierte Tieren ($4,79 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$ Zellen/ μ l) und nicht infiltrierte Tieren ($5,85 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$ Zellen/ μ l).

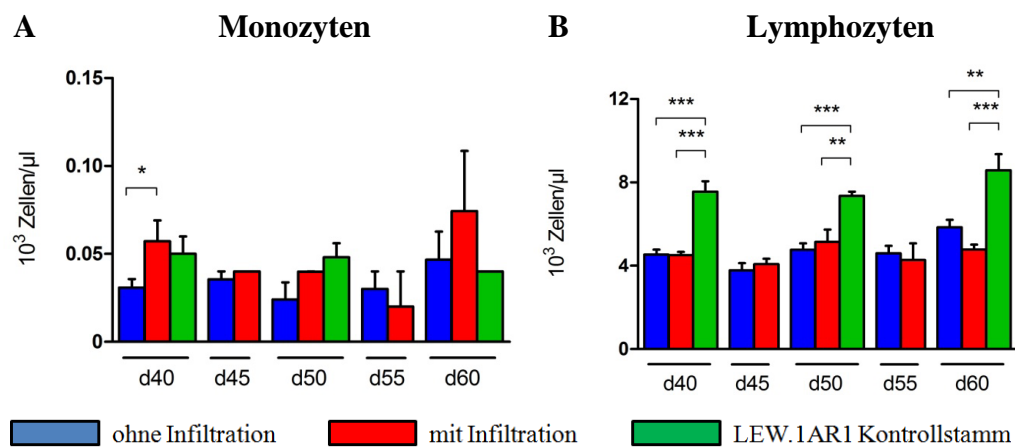


Abbildung 11: Haemogramm normoglykämischer infiltrierte und nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Ratten im Vergleich zum LEW.1AR1-Kontrollstamm. (A) Monozyten und (B) Lymphozyten (in 10^3 Zellen/ μ l Vollblut) wurde zu den Zeitpunkten 40 (n=26), 45 (n=12), 50 (n=13), 55 (n=6) und 60 (n=18) Tagen im Vollblut bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte über one-way ANOVA (Bonferroni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.3.2. Eosinophile-, Neutrophile- und Basophile Granulozyten

Das Differentialblutbild wurde für eosinophile (Abb. 12A), neutrophile (Abb. 12B) und basophile (Abb. 12C) Granulozyten aufgestellt. Dabei wurden infiltrierte und nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere untereinander und mit dem LEW.1AR1 Kontrollstamm im zeitlichen Verlauf verglichen. Hierbei ergab sich zum Zeitpunkt 60 Tage ein signifikant höherer Anteil von eosinophilen Granulozyten (Abb. 12A) bei infiltrierte Tieren ($0,07 \times 10^3 \pm 0,01 \times 10^3$ Zellen/ μ l) im Vergleich zu nicht infiltrierte Tieren ($0,03 \times 10^3 \pm 0,01 \times 10^3$ Zellen/ μ l). Der Gehalt von neutrophilen Granulozyten (Abb. 12B) war zum Zeitpunkt 40 Tage signifikant höher bei infiltrierte Tieren ($1,02 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$ Zellen/ μ l) als bei nicht infiltrierte Vergleichstieren ($0,64 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$ Zellen/ μ l). Zum Zeitpunkt Tag 45 (d45) ergab sich ein signifikant höherer Anteil von neutrophilen Granulozyten bei infiltrierte Tieren ($0,71 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$ Zellen/ μ l) im Vergleich zu nicht infiltrierte Tieren ($0,56 \times 10^3 \pm 0,03 \times 10^3$ Zellen/ μ l). Tag 50 war gekennzeichnet durch einen signifikant höheren Anteil von neutrophilen Granulozyten im

LEW.1AR1 Kontrolltierstamm ($1,07 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$ Zellen/ μl) im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren ($0,53 \times 10^3 \pm 0,02 \times 10^3$ Zellen/ μl). Ein signifikant höherer Anteil von neutrophilen Granulozyten konnte auch bei infiltrierten Tieren ($0,73 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$ Zellen/ μl) im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren ($0,53 \times 10^3 \pm 0,02 \times 10^3$ Zellen/ μl) zum Tag 50 nachgewiesen werden. Die Zellpopulationen der basophilen Granulozyten (Abb. 12C) zeigten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Vergleichsgruppen.

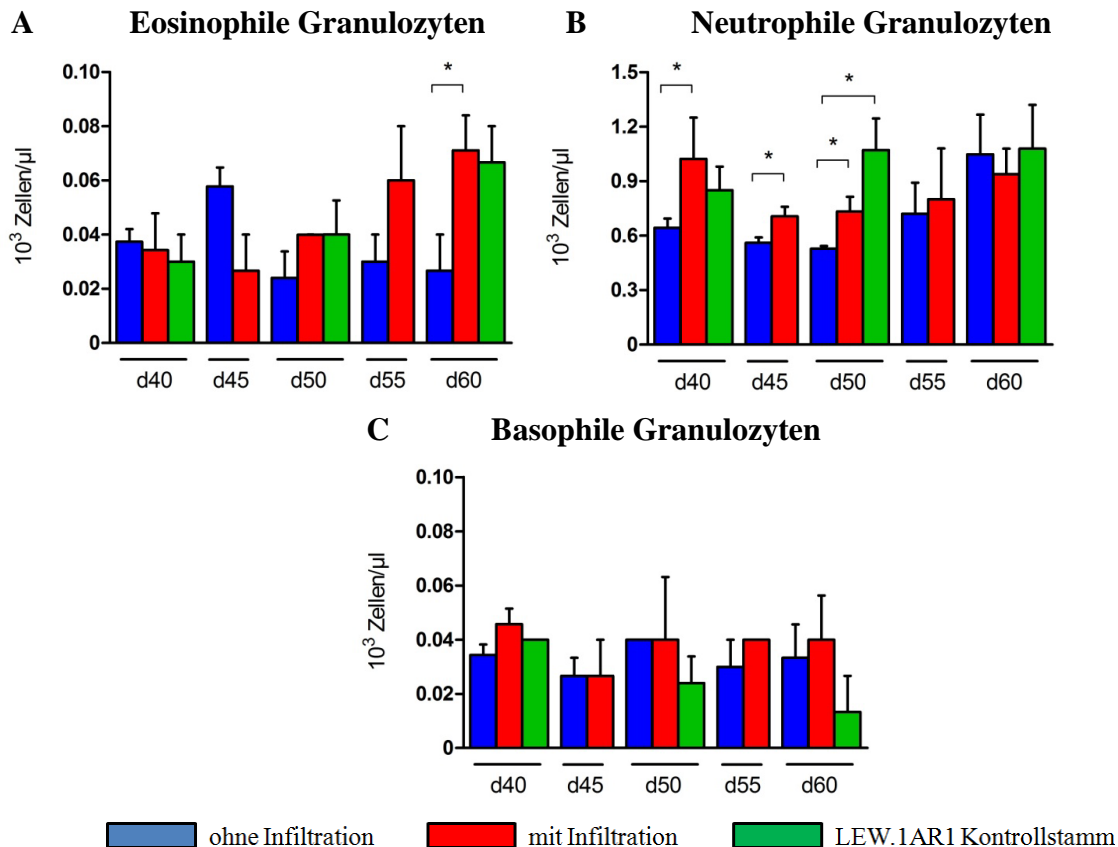


Abbildung 12: Haemogramm normoglykämischer infiltrierter und nicht infiltrierter LEW.1AR1-*iddm* Ratten im Vergleich zum LEW.1AR1-Kontrollstamm. (A) eosinophile-, (B) neutrophile und (C) basophile Granulozyten (in 10^3 Zellen/ μl Vollblut) wurden zu den Zeitpunkten 40 (n=26), 45 (n=12), 50 (n=13), 55 (n=6) und 60 (n=18) Tagen im Vollblut bestimmt. Der LEW.1AR1-Kontrollstamm wurde zu jedem Zeitpunkt (n=5) als Kontrolle mitgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte über one way ANOVA (Bonferroni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

3.4. Bestimmung morphologischer Parameter zu spezifischen Zeitpunkten

3.4.1. Bestimmung der Betazellmasse

Die Bestimmung der Betazellmasse erfolgte für die Zeitpunkte 40, 50 und 60 Tage. Zum Zeitpunkt Tag 40 wiesen die infiltrierten Tiere eine signifikant niedrigere Betazellmasse ($2,99 \pm 0,1$ mg) als nicht infiltrierte Tieren ($3,91 \pm 0,3$ mg) auf. Tag 50 war dadurch gekennzeichnet, dass infiltrierte Tiere eine signifikant niedrigere Betazellmasse ($3,7 \pm 0,4$ mg) aufwiesen als nicht infiltrierte Vergleichstiere ($5,03 \pm 0,4$ mg). Der Zeitpunkt Tag 60 war gekennzeichnet

durch eine signifikant niedrigere Betazellmasse bei infiltrierten Tieren ($3,78 \pm 0,5$ mg) im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren ($5,7 \pm 0,3$ mg) (Abb. 13).

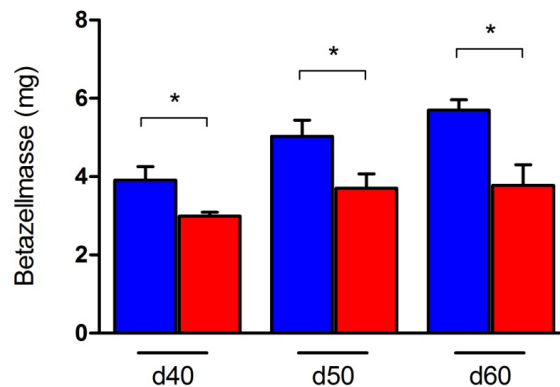


Abbildung 13: Altersabhängige Steigerung der Betazellmasse in normoglykämischen in LEW.1AR1-*iddm* Ratten in Abhängigkeit des Infiltrationsstatus. Die Betazellmasse wurde unter Berücksichtigung des Pankreasgewichtes kalkuliert. Eine statistische Auswertung erfolgte über ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n= 5-6); * P < 0,05.

Die Darstellung des Verlaufes der Zunahme des Betazellmassegehaltes (Abb. 14) ergab einen stärkeren Anstieg für nicht infiltrierte Tiere ($0,089 \pm 0,03$ mg) im Vergleich zu infiltrierten Tieren ($0,039 \pm 0,03$ mg).

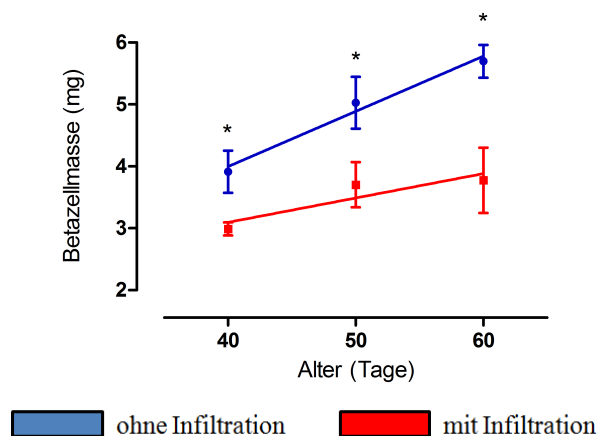


Abbildung 14: Altersabhängiger Anstieg der Betazellmasse in LEW.1AR1-*iddm* Tieren. Die in Abb. 13 dargestellten Änderungen der Betazellmassen wurden einer linearen Regressionanalyse unterzogen. Die lineare Regressionanalyse erfolgte über die Prism-Software. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n= 5-6) * P < 0,05 (F-Test) infiltrierte ($R^2 = 0,47$) Pankreasinseln verglichen mit nicht infiltrierte ($R^2 = 0,15$) Pankreasinseln.

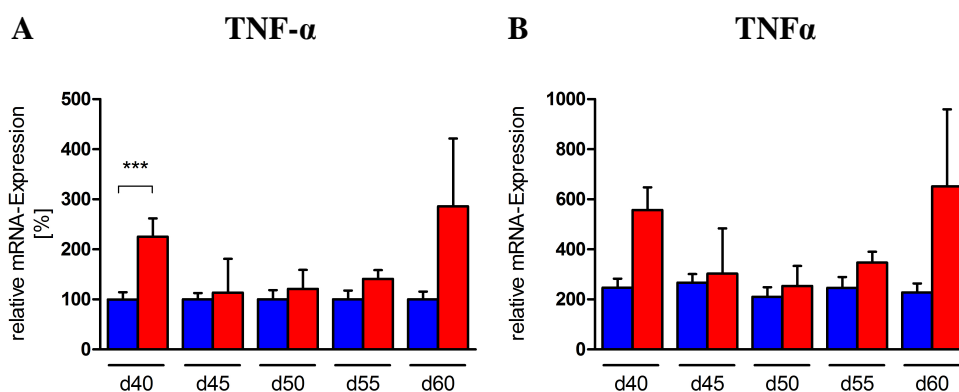
3.5. Genexpressionsmuster der Biomarker der mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu spezifischen Zeitpunkten

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurden in zwei verschiedenen Darstellungsformen ausgegeben wobei einmal die prozentuale Genexpression und die relativen Genexpressionswerte dargestellt wurden. Die prozentuale Diagrammform wurde genutzt um einen besseren Vergleich eines Genexpressionsmarkers zu einem bestimmten Zeitpunkt für die infiltrierte und nicht

infiltrierten Tiere darstellen zu können. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit sind für jeden einzelnen Zeitpunkt die nicht infiltrierten Tiere auf das Genexpressionsniveau von 100 % gesetzt worden. Zusätzlich wurde in der prozentualen Darstellungsform die Ergebnisse mittels t-Test statistisch ausgewertet. In der Darstellungsform der relativen Genexpression wurde ein Vergleich hinsichtlich der Genexpressionsentwicklung im zeitlichen Verlauf vorgenommen worden. Dafür wurden die infiltrierten Tiere im zeitlichen Verlauf einer statistischen oneWay-ANOVA-Analyse unterzogen.

3.5.1. Proinflammatorische Zytokine *TNF- α* , *IFN- γ* und *IL-1 β*

Die Genexpressionsanalysen im prozentualen Vergleich der proinflammatorische Zytokine zeigten eine signifikante, mehr als doppelt so hohe Expression um 125 % bei *TNF- α* , um 110 % bei *IFN- γ* und um 98 % bei *IL-1 β* in Tieren mit lymphozytären Infiltrationen innerhalb des Pankreas im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 40 Tage (Abb. 15 A, C, E). Die Darstellungsform der relativen Genexpressionsanalysen zeigten zum Zeitpunkt 40 Tage zwar die gleichen signifikanten Unterschiede für *TNF- α* (556 ± 91 vs. 247 ± 35), *IFN- γ* (649 ± 80 vs. 308 ± 48) und *IL-1 β* (193 ± 52 vs. 97 ± 20) jedoch konnte auch kein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Gesamtgenexpression nachgewiesen werden (Abb. 15 B, D, F). Desweiteren konnte eine erneut signifikant gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine um 127 % bei *IFN- γ* , um 172 % bei *IL-1 β* zum Zeitpunkt 50 Tage bei infiltrierten Tieren im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren festgestellt werden (Abb. 15 C, E). Die Werte der relativen Expressionsdaten ergaben auch hier für *IFN- γ* (548 ± 148 vs. 241 ± 46) und *IL-1 β* (80 ± 18 vs. 29 ± 5) signifikant höhere Expressionslevel in infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 50 Tage (Abb. 15 D, F). Zum späten Zeitpunkt von 60 Tagen konnte eine signifikant gesteigerte *IFN- γ* Genexpression um 216 % in infiltrierten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 15 C) wobei sich hier im zeitlichen Verlauf der relativen Genexpression (648 ± 196 vs. 204 ± 24) keine Unterschiede bei den infiltrierten Tieren aufzeigten (Abb. 15 D).



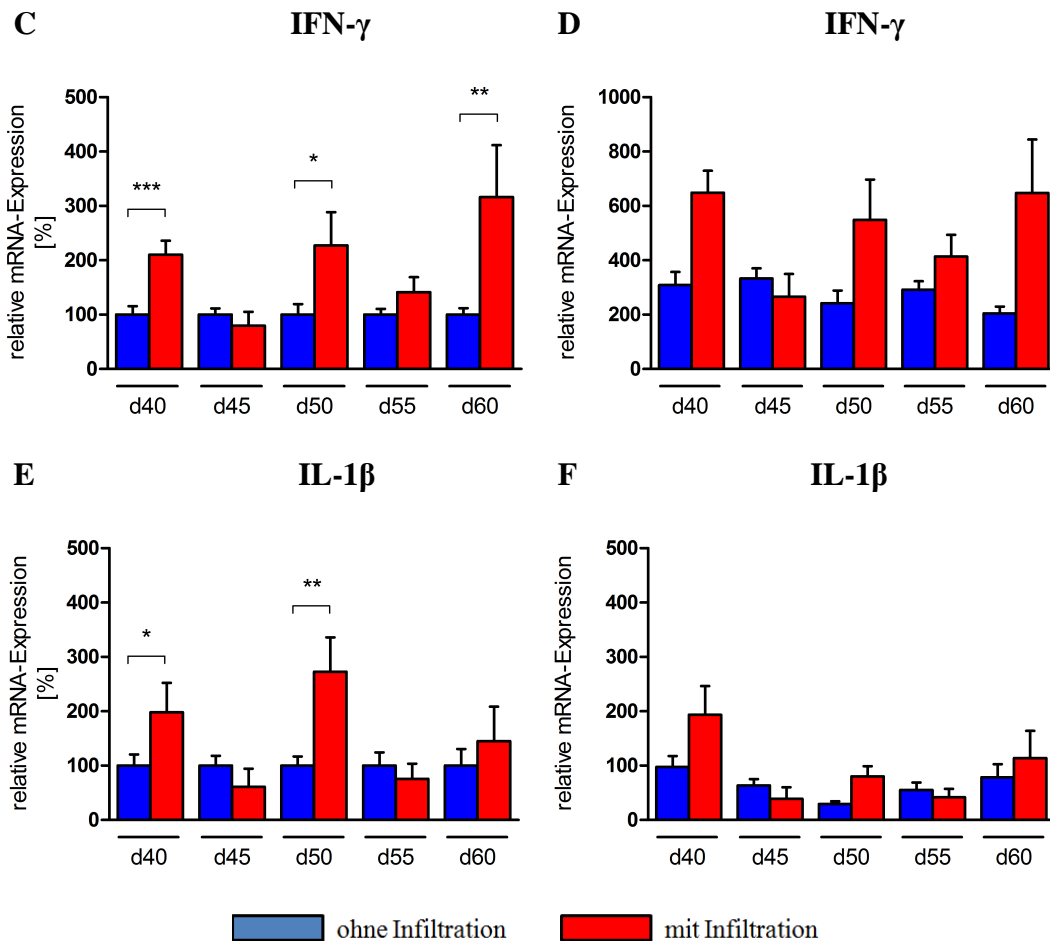


Abbildung 15: Genexpression proinflammatorischer Zytokine von normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. (A, C, E) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zur relativen mRNA-Expression (B, D, F) TNF- α (A, B), IFN- γ (C, D) und IL-1 β (E, F). Die RNA Analyse erfolgte im zeitlichen Verlauf an 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach der Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Infiltrierte Tiere wurden mit nicht infiltrierten Tieren verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte über t-Test und oneWay-ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.5.2. Antiinflammatorische Zytokine *IL-4* und *IL-10*

Die Genexpressionsanalysen im prozentualen Vergleich der antiinflammatorischen Zytokine zeigten eine signifikant gesteigerte Expression um 68 % bei IL-4 und um 147 % bei IL-10 in Tieren mit lymphozytären Infiltrationen innerhalb des Pankreas im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 40 Tage (Abb. 16 A, C). Die Genexpressionsanalysen im relativen Vergleich zeigten ab Zeitpunkt 40 Tage für IL-4 (704 ± 105 vs. 389 ± 74) und IL-10 (287 ± 34 vs. 116 ± 16) signifikante Unterschiede für den zeitlichen Verlauf zwischen den infiltrierten Tieren (Abb. 16 B, D).

Im weiteren Verlauf konnte eine erneut signifikant gesteigerte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 um 88 % zum Zeitpunkt 50 Tage bei infiltrierten Tieren im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren festgestellt werden (Abb. 16 C). Der Vergleich der

relativen Expressionsdaten ergab auch hier für IL-10 (73 ± 14 vs. 39 ± 6) signifikant niedrigere Expressionslevel in infiltrierten Tieren im zeitlichen Verlauf bis zum Zeitpunkt 55 Tage und bei Betrachtung des Genexpressionsniveaus von 40 bis 60 Tagen ein leichtes Absinken (Abb. 16 C, D).

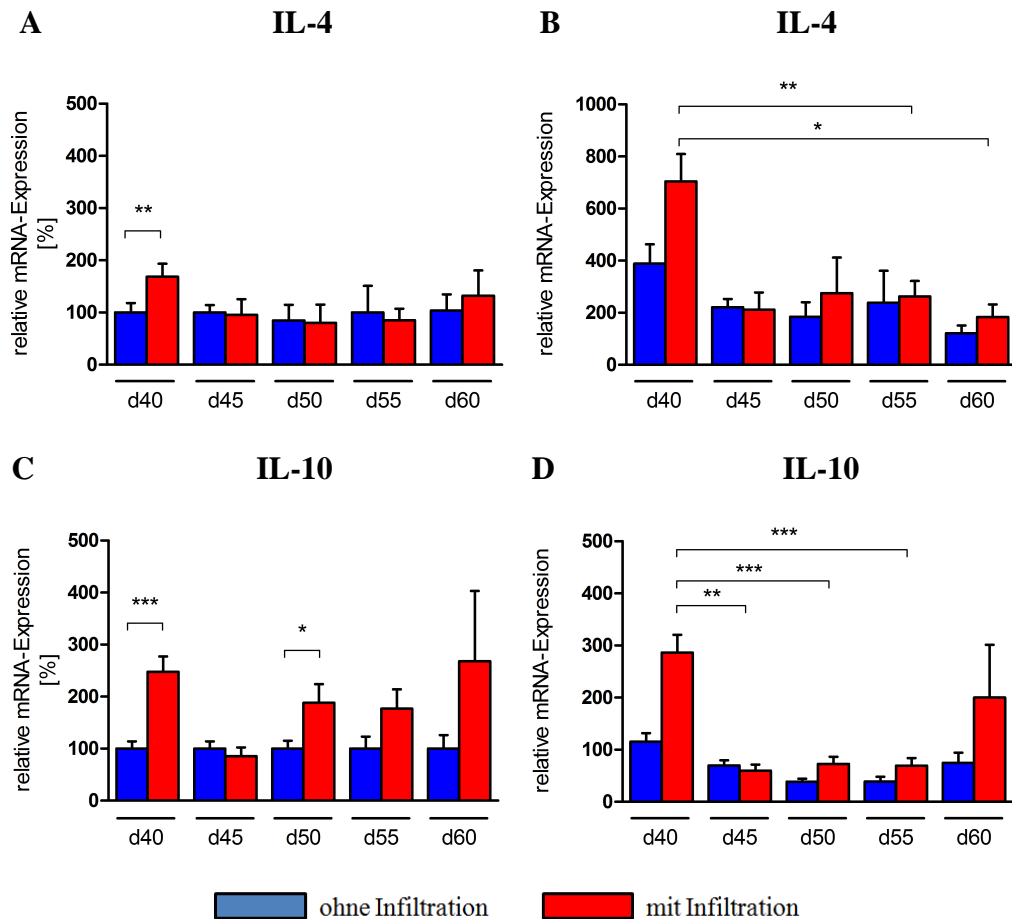
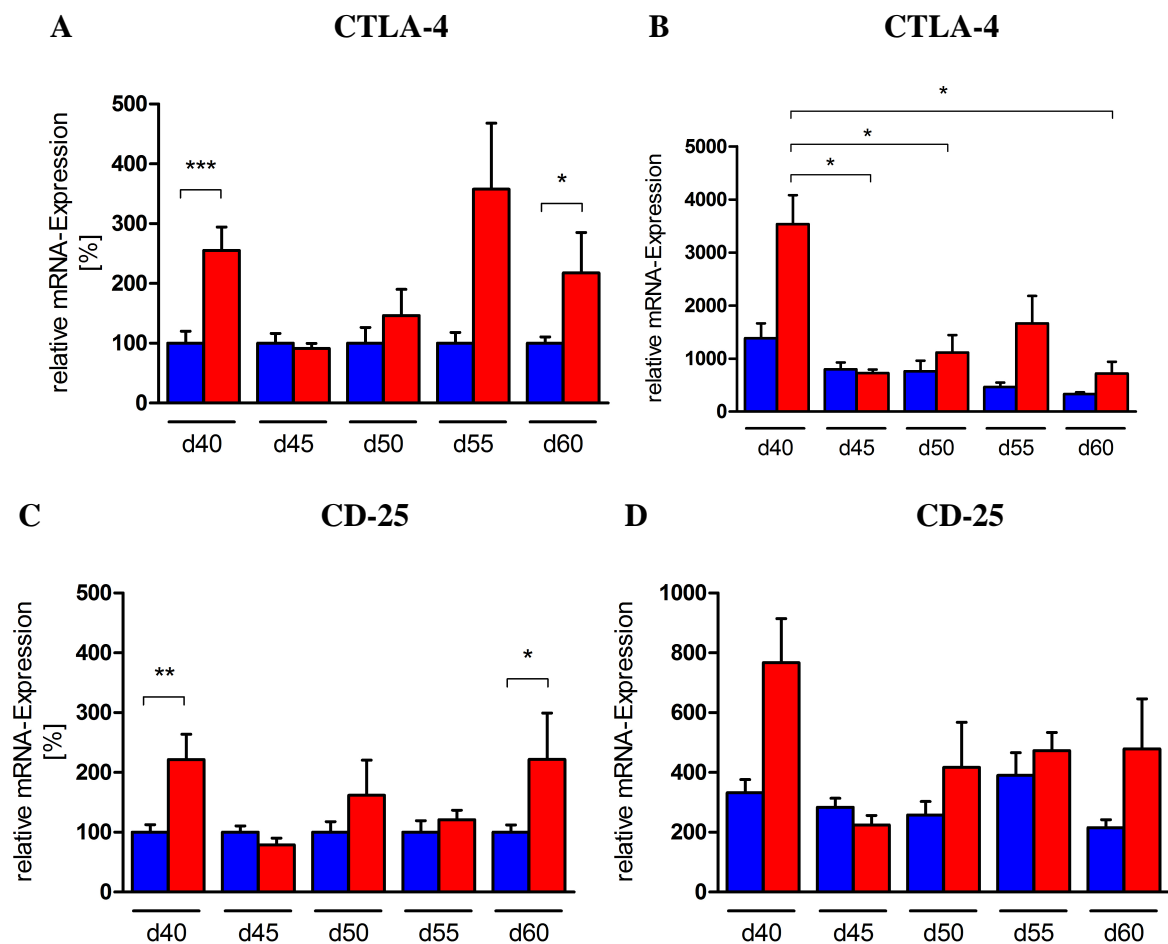


Abbildung 16: Genexpression antiinflammatorischer Zytokine von normoglykämischen LEW.1AR1-iddm Ratten. (A, C) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zur relativen mRNA-Expression (B, D) der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 (A, B) und IL-10 (C, D). Die Analyse erfolgte im zeitlichen Verlauf an 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach der Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Infiltrierte Tiere wurden mit nicht infiltrierten Tieren verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte über t-Test und oneWay ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.5.3. T-Zellmarker Gene CTLA-4, CD-25 und Neuropilin-1

Die Genexpressionsanalysen im prozentualen Vergleich der T-Zellmarker Gene zeigten einen signifikanten Anstieg um 155 % bei CTLA-4, um 121 % bei CD-25 und um 71 % bei Neuropilin-1 in Tieren mit lymphozytären Pankreasinfiltrationen zum Zeitpunkt 40 Tage (Abb. 17 A, C, E). Die Genexpressionsanalysen des relativen Vergleichs zeigten ausgehend von Zeitpunkt 40 Tagen für CTLA-4 (3537 ± 542 vs. 1385 ± 278) einen signifikanten Abfall im zeitlichen Verlauf. CD-25 (766 ± 147 vs. 332 ± 44) zeigte ab Tag 40 keine signifikanten

Unterschiede im zeitlichen Verlauf bis Tag 60. Für Neuropilin-1 (375 ± 49 vs. 218 ± 29) konnte ausgehend von Tag 40 jedoch ein Abfall mit erneut signifikantem Anstieg gemessen werden. Zum Zeitpunkt 55 Tage konnte eine um 88 % gesteigerte Genexpression von Neuropilin-1 in infiltrierten Tieren im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren festgestellt werden (Abb. 17 E). Die relative Genexpression von Neuropilin-1 (161 ± 24 vs. 85 ± 9) zeigte eine signifikant erhöhtes Niveau und gleichzeitig einen leichten Abfall der Gesamtexpression im Vergleich zum Zeitpunkt 40 Tage bei infiltrierten Tieren (Abb. 17 F). Zum späten Zeitpunkt von 60 Tagen konnte eine signifikant gesteigerte Expression um 117 % bei CTLA-4, 121 % bei CD-25 und 369 % bei NRP1 in infiltrierten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 17 A, C, E). Die Ergebnisse der relativen Genexpression von CTLA-4 (718 ± 223 vs. 330 ± 36), CD-25 (478 ± 167 vs. 216 ± 26) und NRP1 (820 ± 403 vs. 175 ± 34) bestätigen hier eine signifikant niedrigere Genexpression infiltrierter Tiere für CTLA-4 und einen Anstieg zum Tag 60 bei NRP1 im zeitlichen Verlauf.



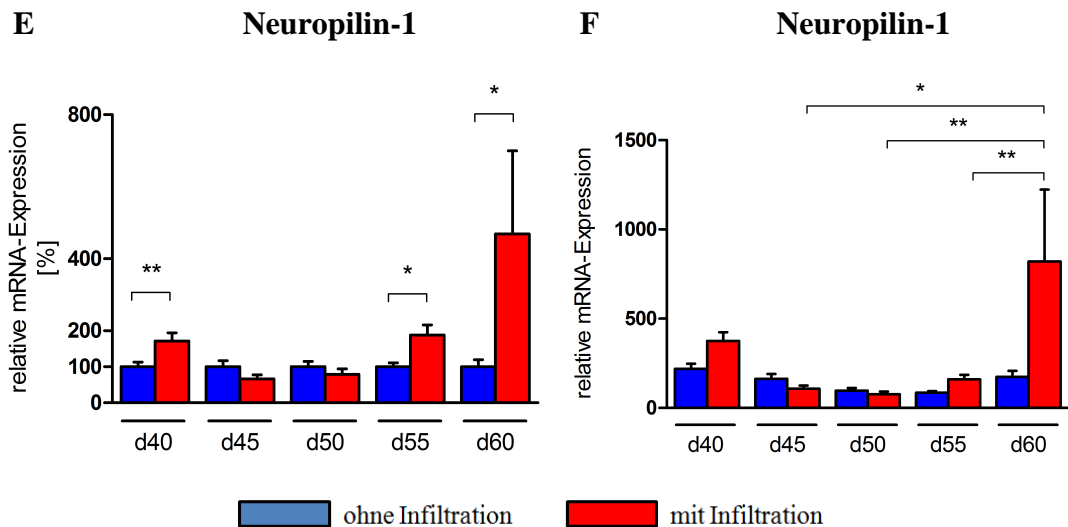


Abbildung 17: Genexpression von T-Zellmarkern normoglykämischer LEW.1AR1-*iddm* Tiere. (A, C, E) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zur relativen mRNA-Expression (B, D, F) der T-Zellmarkergene CTLA4 (A, B), CD-25 (C, D) und NRP1 (E, F). Die Analyse erfolgte im zeitlichen Verlauf an 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach der Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Infiltrierte Tiere wurden mit nicht infiltrierten Tieren verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte über t-Test und oneWay ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.5.4. Regulatorische Gene *TGF- β* , *FoxP3* und *L-Selektin*

Die Genexpressionsanalysen im prozentualen Vergleich der regulatorischen Gene zeigten eine signifikant gesteigerte Expression um 108 % bei *TGF- β* , um 125 % bei *FoxP3* und um 105 % bei *L-Selektin* in Tieren mit lymphozytären Infiltrationen innerhalb des Pankreas im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 40 Tage (d40) (Abb. 18 A, C, E).

Die Genexpressionsanalysen im relativen Vergleich zeigten ausgehend vom Zeitpunkt 40 Tage für *TGF- β* (231 ± 42 vs. 111 ± 12), *FoxP3* (981 ± 133 vs. 434 ± 89) und *L-Selektin* (694 ± 119 vs. 339 ± 46) im zeitlichen Verlauf ein Abfall auf ein nicht signifikant unterschiedliches Genexpressionsniveau bis zum Zeitpunkt 55 Tage (Abb. 18 B, D, F).

Zum Zeitpunkt 55 Tage konnte eine um 94 % gesteigerte Expression von *FoxP3* (Abb. 18 C) und um 96 % von *L-Selektin* (Abb. 18 E) bei infiltrierten Tieren im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren festgestellt werden.

Die relative Genexpression von *FoxP3* (787 ± 111 vs. 406 ± 85) und *L-Selektin* (514 ± 69 vs. 262 ± 39) zeigte ein erhöhtes Niveau und gleichzeitig einen leichten Abfall der Gesamtexpression im Vergleich zum Zeitpunkt 40 Tage (d40) bei infiltrierten Tieren (Abb. 18 D, F).

Zum Zeitpunkt 60 Tage (d60) senkten sich die Genexpressionslevel wieder auf ein nicht signifikant unterschiedliches Niveau aller Marker ab.

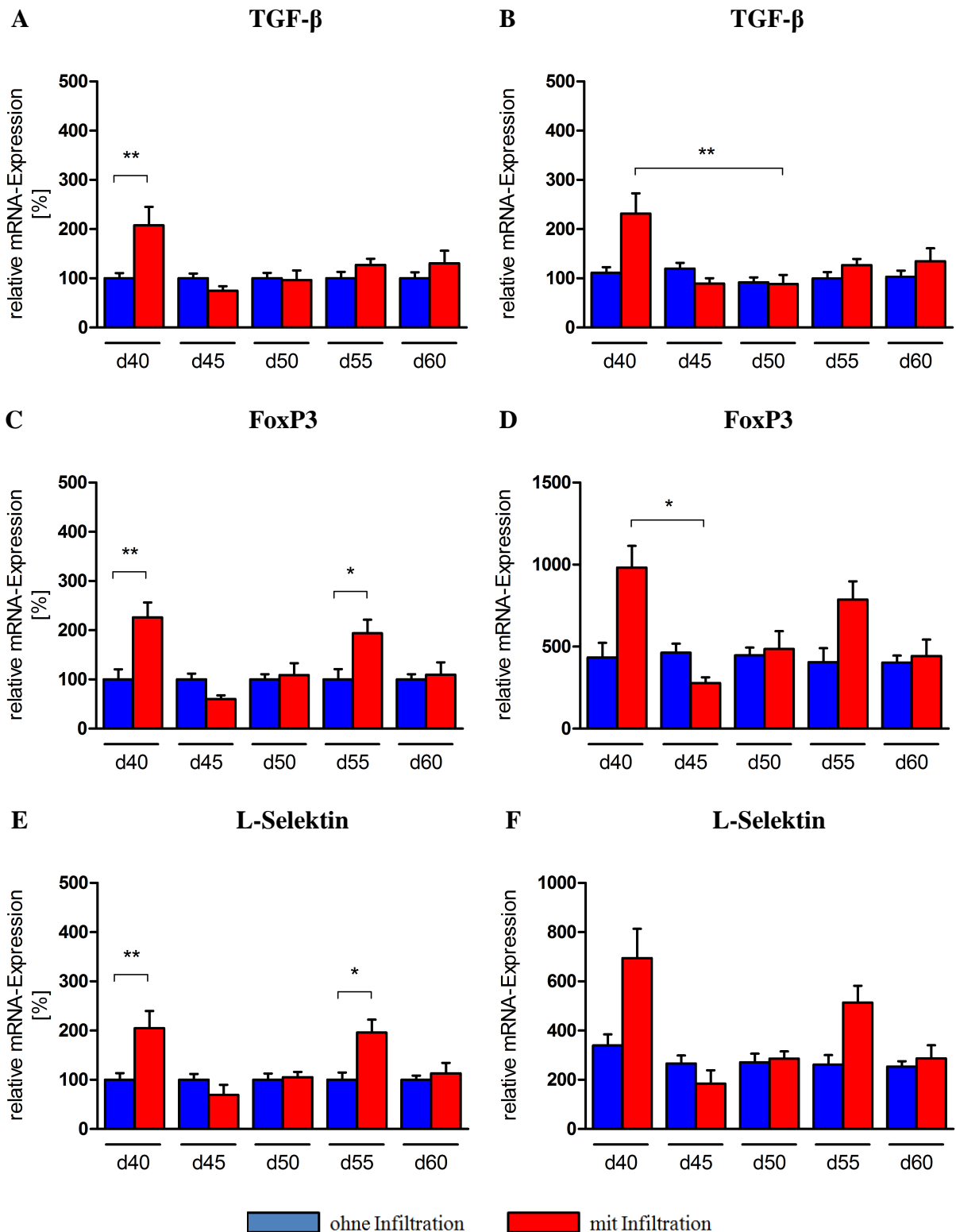


Abbildung 18: Genexpression regulatorischer Gene in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Tieren. (A, C, E) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zur relativen mRNA-Expression (B, D, F) der regulatorischen Gene TGF- β (A, B), FoxP3 (C, D) und L-Selektin (E, F). Die Analyse erfolgte im zeitlichen Verlauf an 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Infiltrierte Tiere wurden mit nicht infiltrierten Tieren verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte über t-Test und oneWay ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

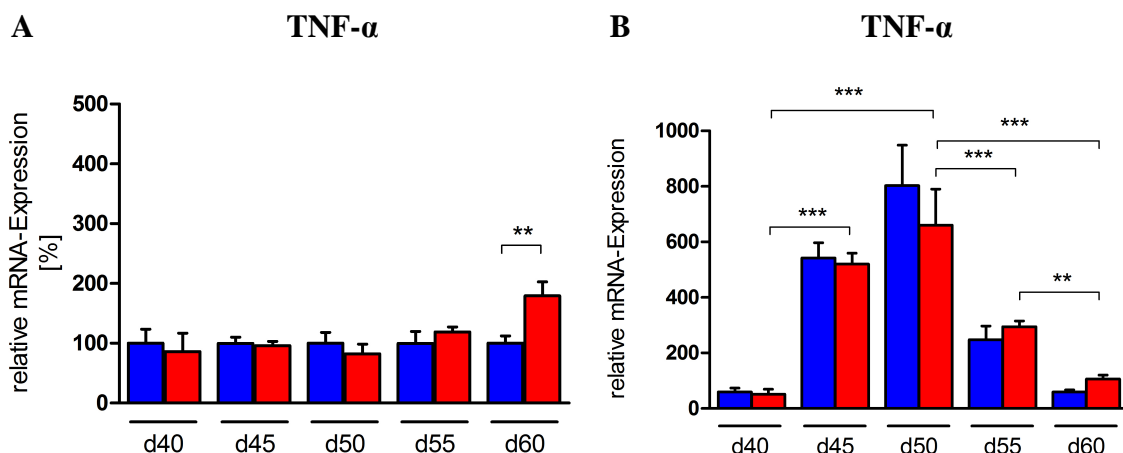
3.6. Genexpressionsmuster der Biomarker der pankreas-drainierenden Lymphknoten zu spezifischen Zeitpunkten

3.6.1. Proinflammatorische Zytokine *TNF- α* , *IFN- γ* und *IL-1 β*

Die Genexpressionsanalysen, im prozentualen Vergleich, der proinflammatorische Zytokine zeigten eine signifikant gesteigerte Expression um 90 % bei *IFN- γ* in Tieren mit lymphozytären Infiltrationen innerhalb des Pankreas im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 45 Tage. Zum späteren Zeitpunkt von 55 Tagen wurde *IFN- γ* mehr als dreifach (217 %) so hoch in infiltrierten Tieren exprimiert (Abb. 19 C). Zum späten Zeitpunkt von 60 Tagen wurden die proinflammatorischen Zytokine *IFN- γ* um 253 % und *TNF- α* um 79 % signifikant höher in infiltrierten Tieren exprimiert. Für *IL-1 β* konnten keine signifikanten Unterschiede der Genexpression festgestellt werden (Abb. 19 A, C).

Im relativen Vergleich zeigte sich zum Zeitpunkt 45 Tage die Expressionsunterschiede für *IFN- γ* (843 ± 94 vs. 1600 ± 260), an Zeitpunkt 55 Tage (436 ± 80 vs. 1385 ± 439) und am 60. Tag für (177 ± 48 vs. 627 ± 140) ein signifikanter Anstieg des Genexpressionsniveaus im zeitlichen Verlauf ausgehend von 40 Tagen.

Der signifikante Genexpressionsunterschied von *TNF- α* (59 ± 7 vs. 106 ± 14) zeigte sich abschließend zum Zeitpunkt 60 Tage. Ausgehend von Zeitpunkt 40 Tage ging ein signifikanter Anstieg der Genexpression der proinflammatorischen Zytokine bis zum mittleren Zeitpunkt von 50 Tagen voraus, welchem ein Abfall der Genexpression bis zum 60. Tag folgte. Dabei wiesen *TNF- α* und *IL-1 β* im zeitlichen Verlauf in den infiltrierten Tieren Genexpressionsniveaus auf die mit einem Maximum an Tag 50 und einem Minimum an Tag 40 und Tag 60 gekennzeichnet waren (Abb. 19 B, D, F).



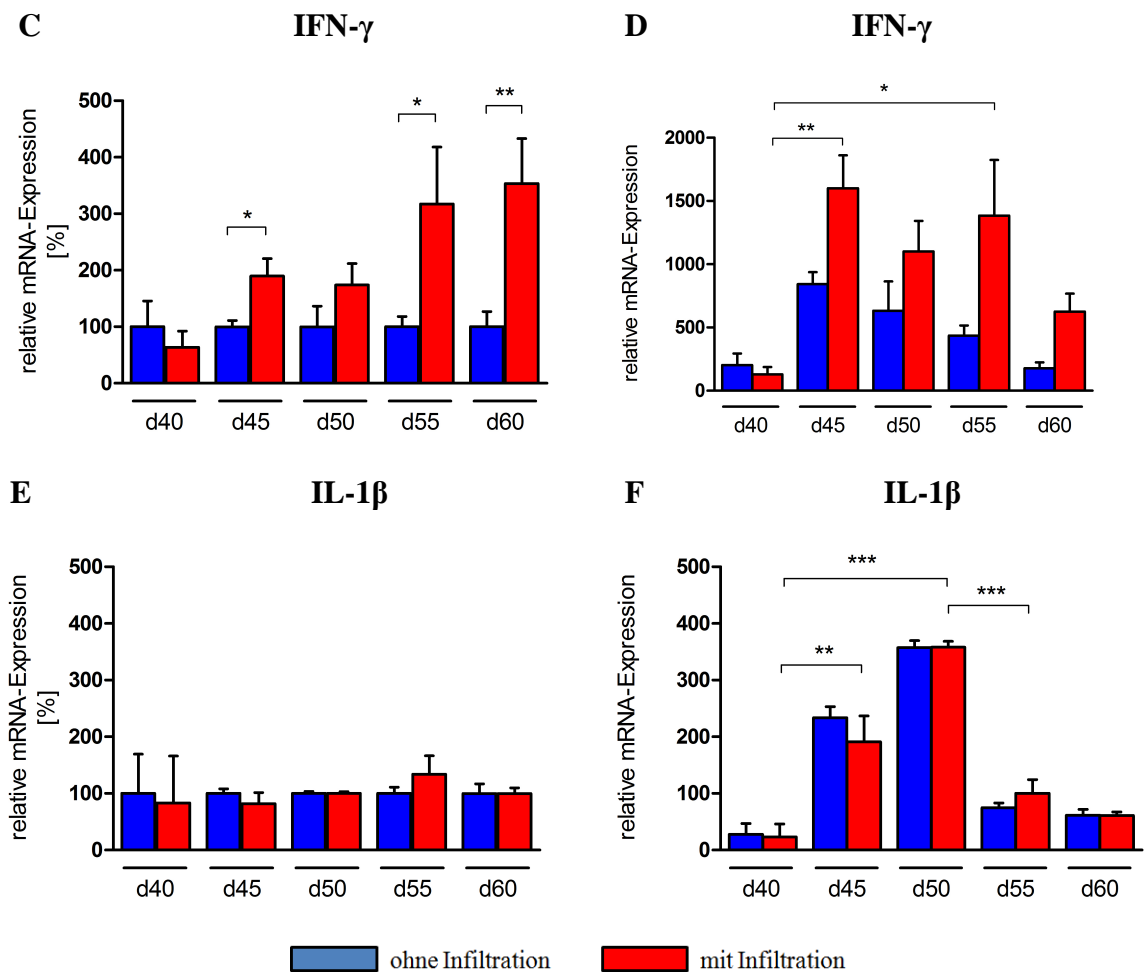


Abbildung 19: Genexpression proinflammatorischer Zytokine von normoglykämischen LEW.IAR1-*iddm* Tieren. (A, C, E) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zur relativen mRNA-Expression (B, D, F) von TNF- α (A, B), IFN- γ (C, D) und IL-1 β (E, F). Die Analyse erfolgte 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach der Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Infiltrierte Tiere wurden mit nicht infiltrierte Tiere verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte über ANOVA (Bonferroni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.6.2. Antiinflammatorische Zytokine IL-4 und IL-10

Die Genexpressionsanalysen, im prozentualen Vergleich, der antiinflammatorische Zytokine zeigten eine signifikant gesteigerte Expression um 150 % bei IL-4 zum Zeitpunkt 50 Tage und IL-10 um 81 % zum Zeitpunkt 60 Tage in Tieren mit lymphozytären Infiltrationen innerhalb des Pankreas im Vergleich zu nicht infiltrierte Tiere.

Die Genexpressionsanalysen, im relativen Vergleich, zeigten das IL-4 (1452 ± 316 vs. 3626 ± 1043) ausgehend von Zeitpunkt 50 Tage und IL-10 (191 ± 40 vs. 346 ± 55) erst signifikant höher im zeitlichen Verlauf bis Tag 60 dann signifikant niedriger in infiltrierte Tiere exprimiert wurde. Zusätzlich konnte wie auch bei den proinflammatorischen Zytokinen der allgemeine Expressionsverlauf mit einem Höhepunkt zum Zeitpunkt 50 Tage und einem Abfall der Genexpression zum Tag 60 aufgezeigt werden.

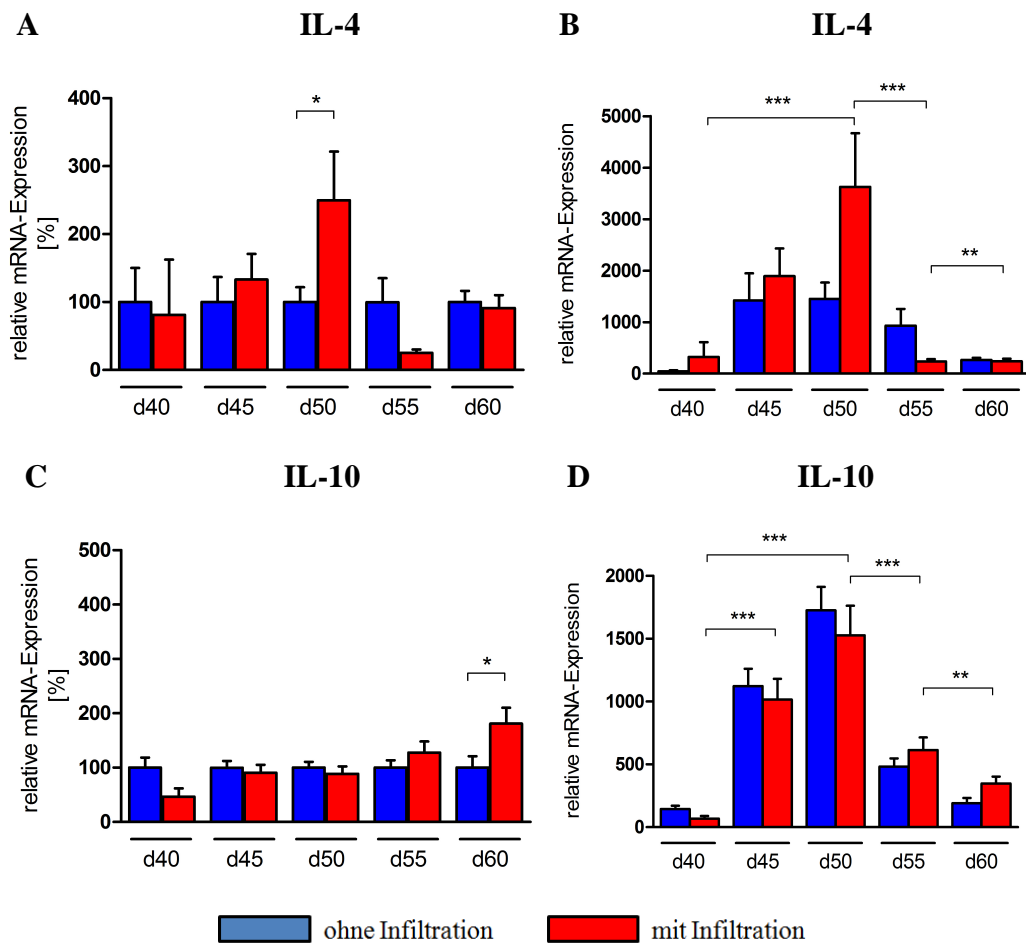


Abbildung 20: Genexpression antiinflammatorischer Zytokine von normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Tieren. (A, C) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zur relativen mRNA-Expression (B, D) der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 (A, B) und IL-10 (C, D). Die Analyse erfolgte im zeitlichen Verlauf an 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach der Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Infiltrierte Tiere wurden mit nicht infiltrierten Tieren verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte über t-Test und oneWay ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.6.3. T-Zellmarkergene *CTLA4*, *CD-25* und *Neuropilin-1*

Die Genexpressionsanalysen, im prozentualen Vergleich, der T-Zellmarkergene zeigten eine signifikant gesteigerte Expression um 89 % bei CD-25 zum Zeitpunkt 40 Tage. Erst im späteren zeitlichen Verlauf wurde ein signifikanter Anstieg der Genexpression um 153 % bei Neuropilin-1 zu Tag 55, für CTLA-4 um 197 % und CD-25 um 62 % zum Zeitpunkt 60 Tage nachgewiesen. Dabei traten die signifikant höheren Genexpressionslevel stets in Tieren mit lymphozytären Infiltrationen des Pankreas auf (Abb. 21 A, C, E). Die Expressionsanalysen, im relativen Vergleich, zeigten ausgehend von Tag 50 für CTLA-4 im zeitlichen Verlauf bis Tag 60 (73 ± 15 vs. 217 ± 43) signifikant niedrigere Genexpressionslevel in infiltrierten Tieren. CD-25 wurde an Tag 40 (53 ± 9 vs. 100 ± 20) und Tag 60 (75 ± 10 vs. 123 ± 15) signifikant niedriger an

Tag 50 in infiltrierten Tieren exprimiert. NRP1 zeigte zum Tag 55 signifikant höhere Genexpressionsniveaus (200 ± 30 vs. 508 ± 111) in infiltrierten Tieren. Auffallend war auch bei den T-Zellmarkern das Ansteigen der Genexpression, ausgehend von Tag 40 bis Tag 50 mit einem erneuten Abfall zum Zeitpunkt 60 Tage (Abb. 21 B, D, F).

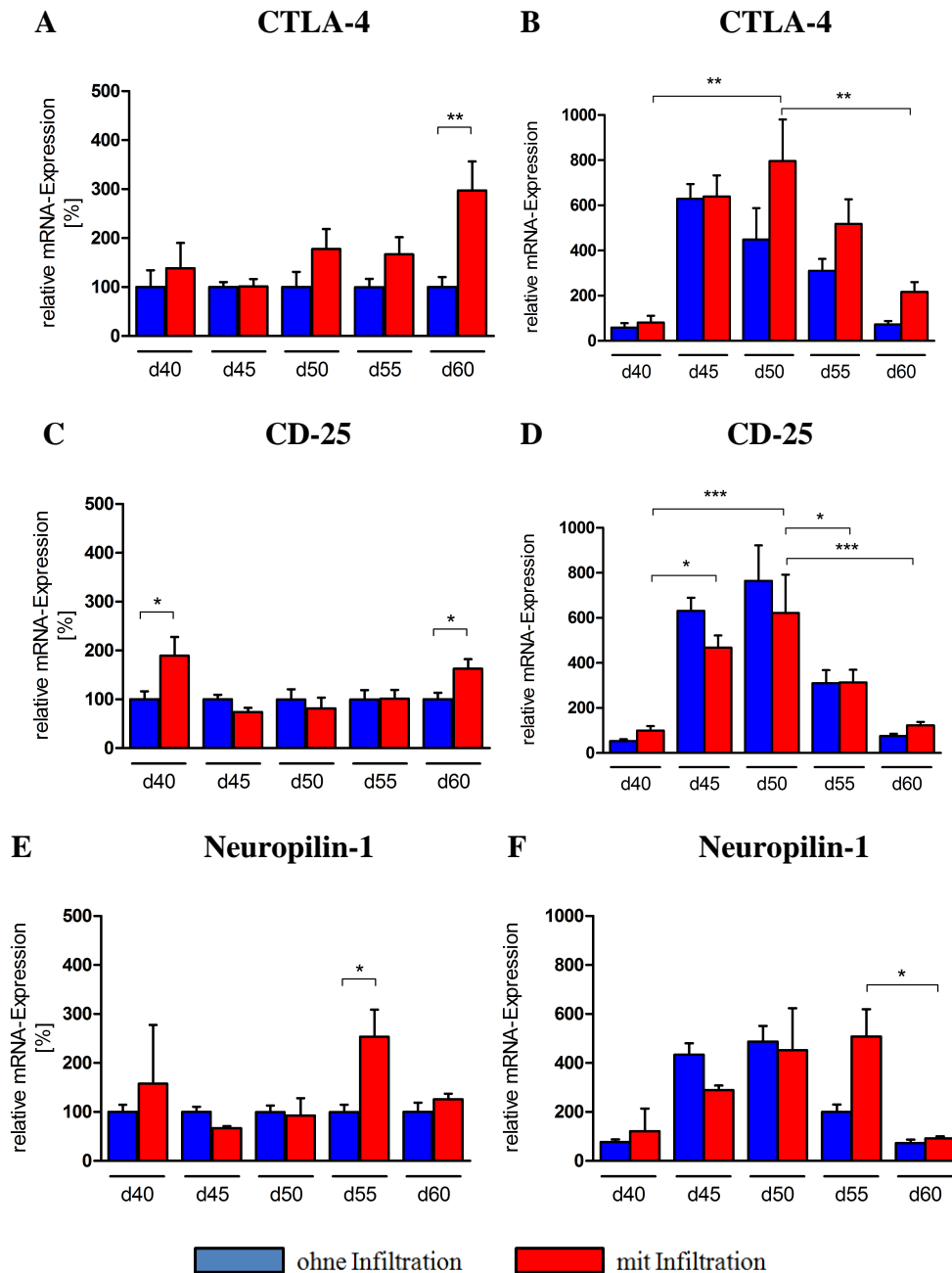


Abbildung 21: Genexpression von T-Zellmarkern normoglykämischer LEW.1AR1-*iddm* Tiere. (A, C, E) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zur relativen mRNA-Expression (B, D, F) der T-Zellmarkergene CTLA4 (A, B), CD-25 (C, D) und NRP1 (E, F). Die Analyse erfolgte im zeitlichen Verlauf an 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Infiltrierte Tiere wurden mit nicht infiltrierten Tieren verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte über t-Test und ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

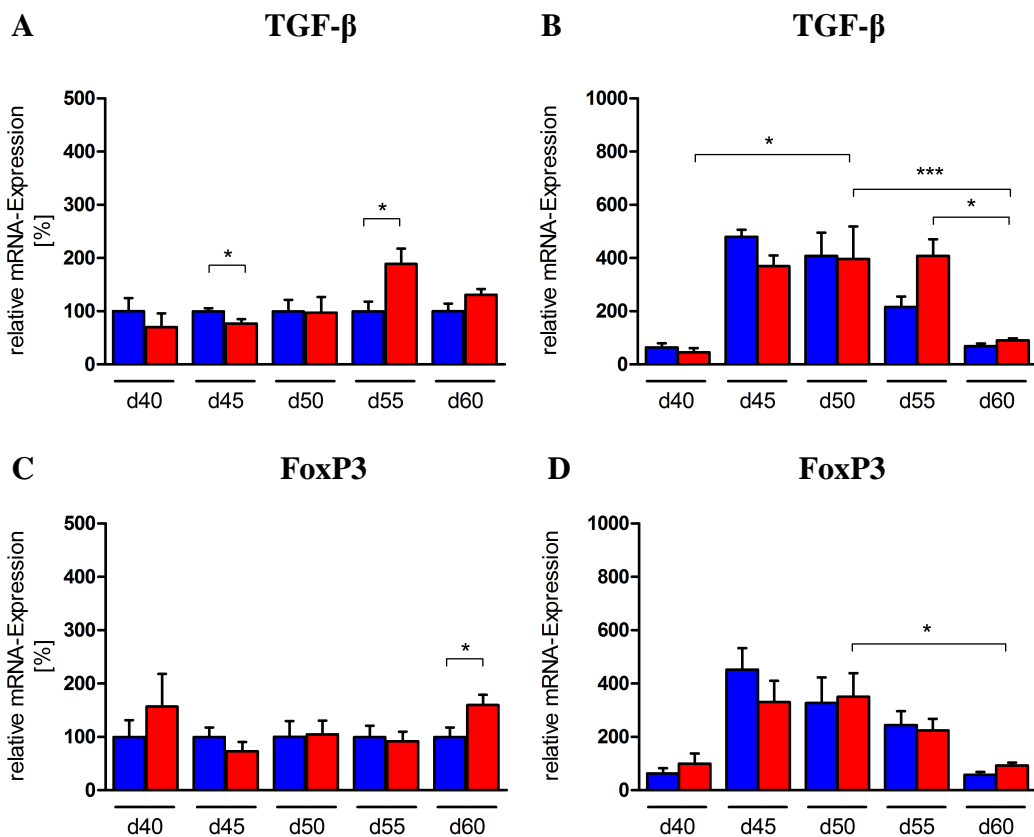
3.6.4. Regulatorische Marker *TGF-β*, *FoxP3* und *L-Selektin*

Die Genexpressionsanalysen, im prozentualen Vergleich, zeigten für die regulatorischen Marker eine um 23 % verminderte Expression von *TGF-β* zum Zeitpunkt 45 Tage bei infiltrierten Tieren. Darauf folgte zum späteren Zeitpunkt Tag 55 eine um 88 % signifikant gesteigerte Expression in infiltrierten Tieren von *TGF-β*. Der Transkriptionsregulator *FoxP3* zeigte am späten Zeitpunkt der Infiltrationsphase eine um 60 % gesteigerte Genexpression in infiltrierten Tieren. Das Adhäsionsmolekül *L-Selektin* wurde zum Zeitpunkt 40 Tage um 207 % und an Tag 60 um 64 % höher in Tieren mit Infiltrationen exprimiert (Abb. 22 A, C, E).

Die Genexpressionsanalysen, im relativen Vergleich, zeigten dass die Expression von *TGF-β* an Tag 45 (480 ± 26 vs. 370 ± 39) bis Tag 55 höher (216 ± 39 vs. 407 ± 62) in infiltrierten im Vergleich zu anderen infiltrierten Tieren an Tag 40 und 60 war.

Die Expression von *FoxP3* am Zeitpunkt 60 Tage (58 ± 10 vs. 92 ± 11) war in infiltrierten Tieren signifikant niedriger als in Tieren des Zeitpunktes 50 Tage.

Die untersuchten regulatorischen Marker zeigten eine allgemein niedrigere Genexpression zu den Zeitpunkten 40 und 60 Tagen wobei im Zeitraum von 45-55 Tagen oft ein signifikanter Anstieg der Expression auf ein ähnlich erhöhtes Niveau sowohl bei infiltrierten als auch bei nicht infiltrierten Tieren zu beobachten war (Abb. 22 B, D, F).



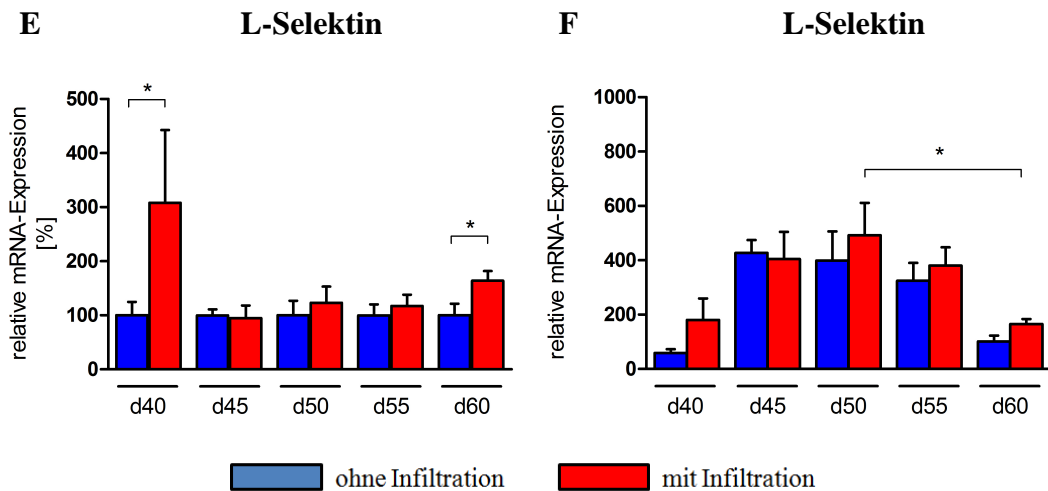


Abbildung 22: Genexpression regulatorischer Gene in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Tieren. (A, C, E) prozentualer Vergleich der mRNA-Expression im Vergleich zu relativer mRNA-Expression (B, D, F) der regulatorischen Gene TGF- β (A, B), FoxP3 (C, D) und L-Selektin (E, F). Die Analyse erfolgte 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen nach der Geburt. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH vorgenommen. Vergleich infiltrierter Tiere mit nicht infiltrierten Tieren. Statistische Auswertung über t-Test und oneWay ANOVA (Bonferoni-Post-Test). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

3.7. Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array-40 Tage

Der PCR Array zum Zeitpunkt 40 Tage zeigte, dass die Genexpression bei 65 von 88 untersuchten Genen ein allgemein in infiltrierten Tieren ansteigt. Gleichzeitig wurden 18 Gene in sehr geringem Umfang niedriger exprimiert als in nicht infiltrierten Tieren (Abb. 23). Die Expression von *IL-8ra* konnte nicht nachgewiesen werden. Die Gene *Ccl2*, *Ccl7*, *Ccl21*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Cxcl11*, *IL-18* und *TNF* wurden um ein Vielfaches höher exprimiert in infiltrierten Tieren im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren.

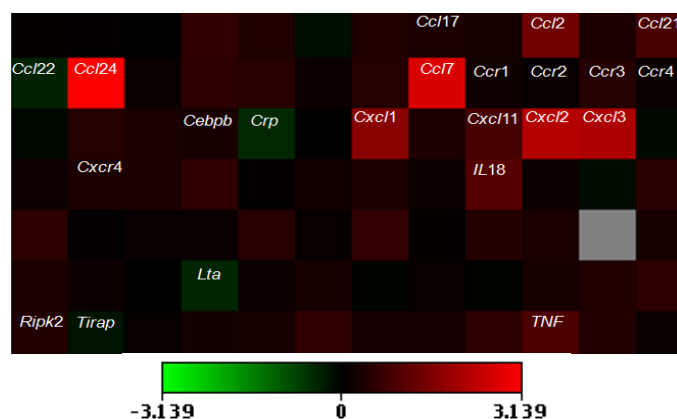


Abbildung 23: Inflammatory Response & Autoimmunity-Array normoglykämischer LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Heatmap-Diagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede (Fold Change in log₂) der mononukleären Zellen des peripheren Blutes zum Zeitpunkt 40 Tage. Nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere wurden als Kontrollgruppe ausgewählt um Genexpressionsunterschiede zu infiltrierten Tiere darstellen zu können (n = 4-5).

Die Gene *Ccl2*, *Cxcl11*, *Ccl21*, *Il-18* und *TNF* wurden 2,1- bis 2,7-fach höher in infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Tieren zum Zeitpunkt 40 Tage exprimiert. Die koexprimierten Gene *Cxcl1*, *Cxcl2* und *Cxcl3* wurden 3,6- bis 5,4-fach stärker in infiltrierten Tieren als in den nicht infiltrierten Tieren des gleichen Zeitpunktes exprimiert. Die stärkste Expression zeigten die Chemokine *Ccl7* und *Ccl24* welche 6,9- bis 8,8-fach stärker in infiltrierten Tieren als in nicht-infiltrierten Tieren exprimiert wurden. (Abb. 24).

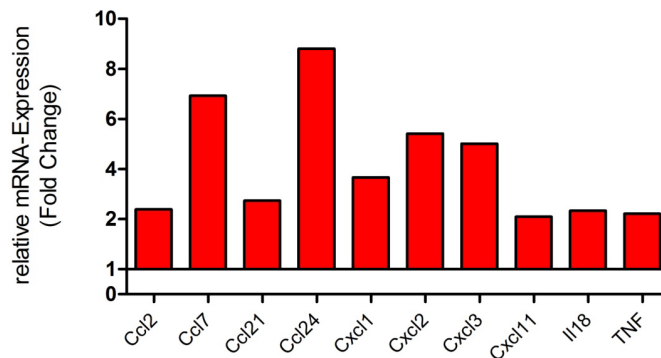


Abbildung 24: Dominant exprimierte Chemokingene in infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Darstellung auffallend exprimierter Gene (*fold change*) der PBMCs zum Zeitpunkt 40 Tage. Nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere bilden die Referenzgruppe mit einer *fold change* von „1“.

3.8. Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array 50 Tage

Der PCR-Array zu 50 Tagen zeigt, dass 64 von 88 untersuchten Gene einen Abfall der Genexpression in infiltrierten Tieren aufwiesen. Zur gleichen Zeit wurden 15 Gene in geringem Umfang und die Gene *Cxcl2*, *Cxcl3* und *IL-22* höher exprimiert. Für die Gene *Ccl21* und *IL-8ra* konnte keine Genexpression nachgewiesen werden. Die Gene *C4b*, *Ccl1*, *Ccl11*, *Ccl17*, *Ccl19*, *Ccl20*, *Ccl24*, *Ccl25*, *Ccr2*, *IL-1a*, *IL-1b*, *IL-1f10*, *IL-22ra2*, *IL-6*, *IL-6r*, *IL-9*, *Kng1*, *Tlr4*, *Tlr7* und *TNF* wurden zum Zeitpunkt 50 Tage in infiltrierten Tieren herunter reguliert (Abb. 25).

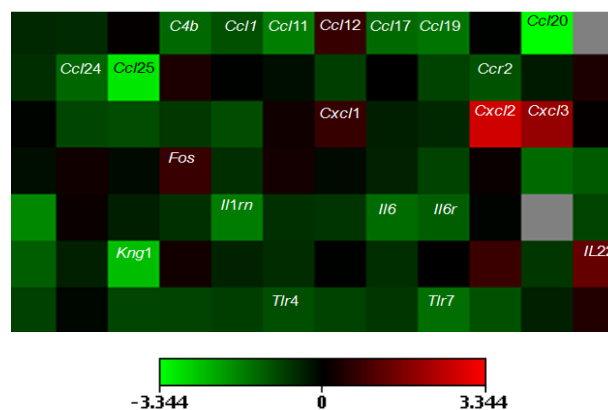


Abbildung 25: Inflammatory Response & Autoimmunity-Array normoglykämischer LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Heatmap-Diagramm zur Darstellung der Expressionsunterschiede (*fold change* in log₂) der PBMCs zum Zeitpunkt 50 Tage. Nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere wurden als Kontrollgruppe ausgewählt um Genexpressionsänderungen der infiltrierten Tiere darstellen zu können (n = 4-5).

Die Expression der Gene *C4b*, *Ccl1*, *Ccl17*, *Ccl24*, *Ccr2*, *IL-1a*, *IL-1b*, *IL-6*, *IL-6r*, *IL-9*, *Tlr4*, *Tlr7* und *TNF* war zum Zeitpunkt 50 Tage nur noch 0,4-fach bis 0,5-fach so stark in den infiltrierten Tieren im Vergleich zu den nicht infiltrierten Tieren. Die stärkste Repression zeigten die Gene *Ccl11*, *Ccl19*, *Ccl20*, *Ccl25*, *IL-1f10*, *IL-22ra2* und *Kngr1* (0,1-fach bis 0,4-fach). Die Gene *Cxcl2*, *Cxcl3* und *IL-22* wurden zwischen 2,5-fach und 6,6-fach stärker in infiltrierten Tieren als in nicht infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 50 Tage exprimiert (Abb. 26).

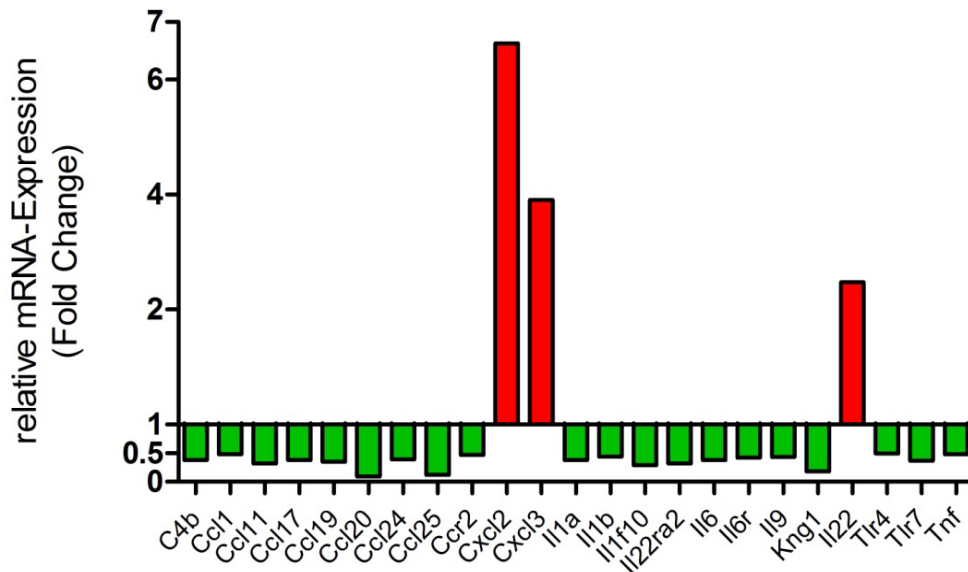


Abbildung 26: Dominant exprimierte Chemokine in infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Tieren. Darstellung deutlich höher (rot) und niedriger (grün) exprimierter Gene der PBMCs zum Zeitpunkt 50 Tage. Nicht-infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere bilden die Referenzgruppe mit einer *fold change* von „1“. Eine relative mRNA Expression mit dem *fold change* Wert „0“ bedeutet, dass keine Genexpression nachweisbar war.

3.9. Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array 60 Tage

Der Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array zum Zeitpunkt 60 Tage zeigte, dass 69 von 88 untersuchten Genen ein allgemeinen Anstieg der Genexpression in infiltrierten Tieren aufwies. Zum gleichen Zeitpunkt wurden 12 Gene in den infiltrierten Tieren niedriger exprimiert als in den nicht infiltrierten Kontrolltieren. Für die Gene *Ccl19*, *IL-8ra* und *IL-9* konnte keine vergleichende Genexpression nachgewiesen werden. Die Genexpression der Gene *C4b*, *Ccl1*, *Ccl2*, *Ccl21*, *Ccl22*, *Ccl24*, *Ccl17*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *IL-18* wurde in infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 60 Tage auffallend hochreguliert (Abb. 27).

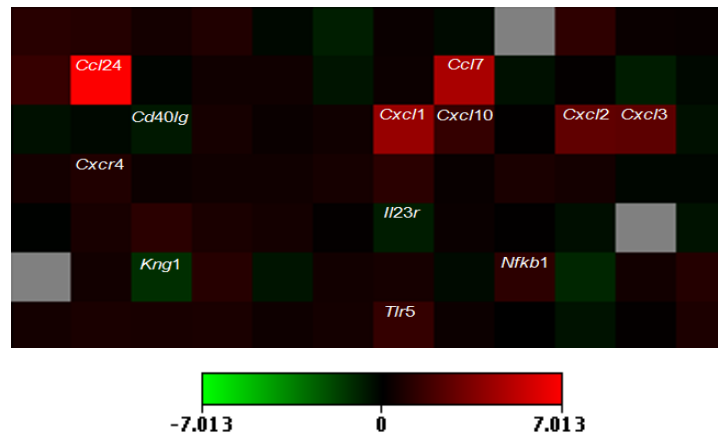


Abbildung 27: Inflammatory Response & Autoimmunity-Array normoglykämischer LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Heatmap-Diagramm zur Darstellung der Genexpression (*fold change* in log₂) der PBMCs zum Zeitpunkt 60 Tage. Nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere wurden als Kontrollgruppe ausgewählt um Genexpressionsänderungen bei infiltrierten Tieren aufzeigen zu können (n = 4-5).

Die Gene *C4b*, *Ccl1*, *Ccl2*, *Ccl21*, *Ccl22* und *IL-18* wurden 2,3-fach bis 5,3-fach so stark in infiltrierten Tieren im Vergleich zu nicht infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 60 Tage exprimiert. Eine stärkere Expression zeigten die koexprimierten Gene *Cxcl1* (33,8-fach), *Cxcl2* (11,7-fach) und *Cxcl3* (10,2-fach) in infiltrierten Tieren. Die stärkste Expression der untersuchten Gene konnte für *Ccl7* (49,7-fach) und *Ccl24* (129,2-fach) in infiltrierten Tieren nachgewiesen werden.

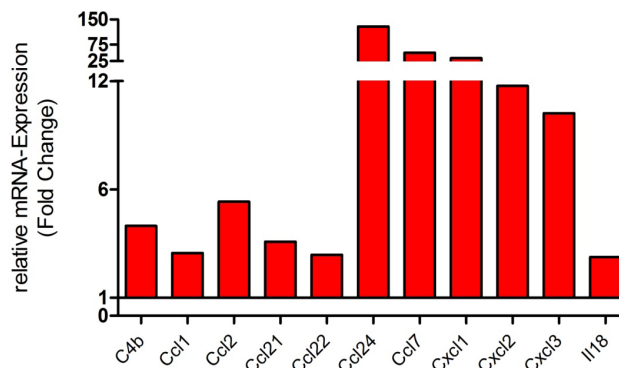


Abbildung 28: Dominant exprimierte Chemokingene in infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Darstellung auffallend höher (rot) exprimierter Gene der PBMCs zum Zeitpunkt 60 Tage. Nicht infiltrierte LEW.1AR1-*iddm* Tiere bilden die Referenzgruppe mit einer *fold change* von „1“.

3.10. Genexpressionsmuster nach RIB5/2 Antikörper-Intervention

3.10.1. Proinflammatorische Zytokine *TNFα*, *INFγ* und *IL-1β*

Die relativen mRNA-Genexpressionsanalysen bei den mit RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren zeigten für *TNFα* eine signifikante Abnahme der Genexpressionslevel zu 50 (252 ± 45 vs. 84 ± 14) und 60 Tagen (252 ± 45 vs. 67 ± 9) im Vergleich zu den 40 Tage alten unbehandelten Tieren. Zusätzlich zeigte sich eine stark verminderte Expression von *TNFα* in RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren zum Zeitpunkt 60 Tage im Vergleich zu den infiltrierten Tieren des gleichen

Zeitpunktes (Abb. 29 A). Die Behandlung durch den RIB5/2 Antikörper zeigte für *IFN γ* signifikant verminderte Expressionslevel im Vergleich zu infiltrierten Tieren zum Zeitpunkt 50 (566 ± 152 vs. 120 ± 14) und 60 Tage (668 ± 202 vs. 185 ± 11) (Abb. 29 B). Der Zeitpunkt 60 Tage zeigte bei den RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren signifikant höhere Genexpressionslevel (85 ± 12 vs. 185 ± 11) von *IFN γ* als in den unbehandelten Kontrolltieren zum Tag 40. Das proinflammatorische Zytokin *IL-1 β* zeigte zum Zeitpunkt 50 Tage eine signifikant verringerte Genexpression (61 ± 11 vs. 27 ± 5) nach Behandlung mit dem RIB5/2 Antikörper im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu Tag 40. RIB5/2 Antikörper behandelte Tiere zeigten an Tag 50 jedoch signifikant höhere Genexpressionslevel für *IL-1 β* (16 ± 4 vs. 27 ± 6) im Vergleich zu infiltrierten Tieren des gleichen Zeitpunktes. Zum Zeitpunkt 60 Tage konnte ebenfalls ein erhöhtes Expressionsniveau von *IL-1 β* in RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren festgestellt werden (Abb. 29 C).

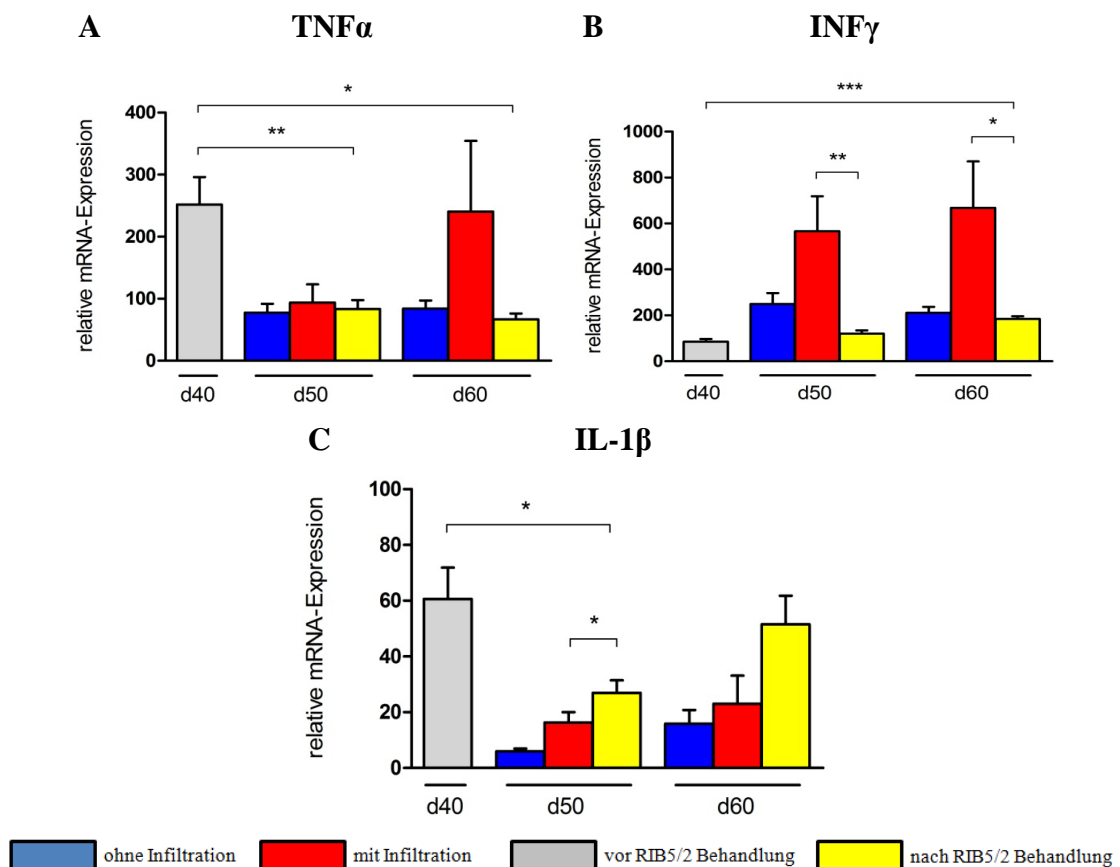


Abbildung 29: Relative mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokinen mit RIB5/2 Antikörper behandelter LEW.1AR1-*iddm* Ratten. (A) *TNF- α* , (B) *IFN γ* und (C) *IL-1 β* der PBMCs in Tieren mit Infiltrationen innerhalb des Pankreas (rot), nicht infiltrierten Tieren (blau) im Vergleich zu Tieren vor RIB5/2 Antikörperbehandlung (grau) und nach RIB5/2 Antikörperbehandlung (gelb) zu den Zeitpunkten von 40, 50 und 60 Tagen. Eine Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.10.2. Antiinflammatorische Zytokine *IL-4* und *IL-10*

Die relative Genexpression des antiinflammatorischen Zytokins *IL-4* zeigte zum Zeitpunkt 50 (890 ± 442 vs. 98 ± 19) und 60 Tage ein (595 ± 154 vs. 204 ± 56) signifikant vermindertes Expressionslevel nach RIB5/2 Antikörperintervention im Vergleich zu infiltrierten Tieren des gleichen Zeitpunktes. (Abb. 30 A). Die Genexpression von *IL-10* wurde durch die RIB5/2 Antikörperbehandlung zum Zeitpunkt 50 Tage im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren signifikant herunter reguliert (68 ± 13 vs. 33 ± 6) (Abb. 30 B).

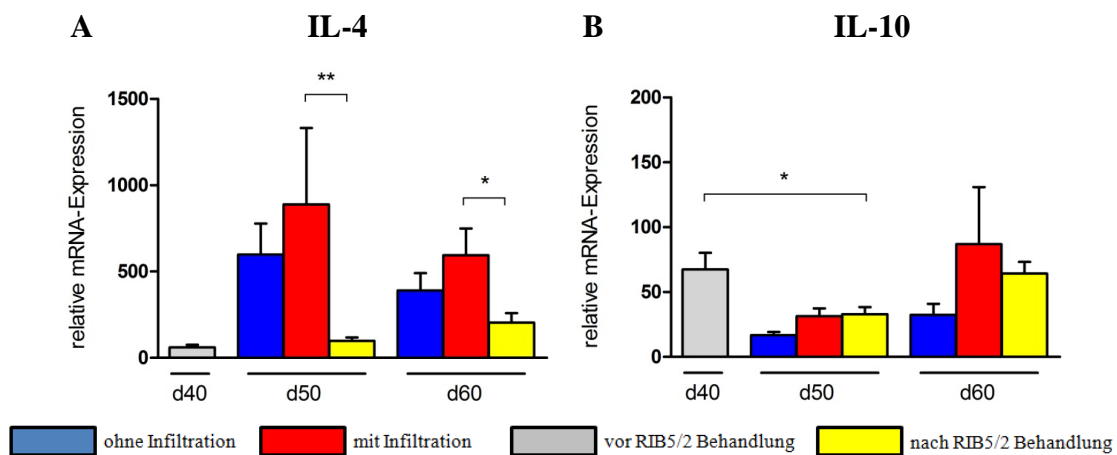


Abbildung 30: Relative mRNA-Expression antiinflammatorischen Zytokine in RIB5/2 Antikörper behandelter LEW.1AR1-*iddm* Tiere. (A) *IL-4* und (B) *IL-10* der PBMCs in Ratten mit Infiltrationen innerhalb des Pankreas (rot), nicht infiltrierten Tieren (blau) im Vergleich zu Tieren vor RIB5/2 Antikörperbehandlung (grau) und nach RIB5/2 Antikörperbehandlung (gelb) zu den Zeitpunkten von 40, 50 und 60 Tagen. Eine Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. Dargestellt sind Mittelwerte ±SEM; * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

3.10.3. T-Zellmarker Gene *CTLA4*, *CD-25* und *Neuropilin-1*

Die relative Genexpression der T-Zellmarker zeigte, dass *CTLA4* zum Zeitpunkt 50 Tage in RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren signifikant niedriger (100 ± 13 vs. 44 ± 6) und zum Zeitpunkt 60 Tage signifikant höher (100 ± 13 vs. 164 ± 27) exprimiert wird als in unbehandelten Kontrolltieren. Zusätzlich konnte zum Zeitpunkt 60 Tage gezeigt werden, dass RIB5/2 Antikörper behandelte Tiere signifikant höhere (22 ± 7 vs. 164 ± 27) Genexpressionslevel von *CTLA4* aufwiesen als infiltrierte Tiere des gleichen Zeitpunktes (Abb. 31 A). Die Genexpressionslevel von *CD-25* waren an Tag 50 in RIB5/2 behandelten Tieren signifikant verringert (66 ± 12 vs. 27 ± 4) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren und zu infiltrierten Tieren (87 ± 31 vs. 27 ± 4). Zum Zeitpunkt 60 Tage stieg das Genexpressionsniveau von *CD-25* auf ein signifikant höheres Maß (66 ± 12 vs. 117 ± 12) in den RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren an

Tag 40 (Abb. 31 B). Der T-Zellmarker *NRP1* wies zum Zeitpunkt 50 Tage signifikant höhere (55 ± 11 vs. 107 ± 9) Genexpressionslevel in Tieren nach RIB5/2 Antikörperintervention im Vergleich zu infiltrierten Tieren des gleichen Zeitpunktes auf. Der gegenteilige Effekt trat zum Zeitpunkt Tag 60 in RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren auf, mit einem signifikant niedrigeren Expressionsniveau (584 ± 287 vs. 105 ± 20) im Vergleich zu infiltrierten Tieren des gleichen Zeitpunktes aufzeigten (Abb. 31 C).

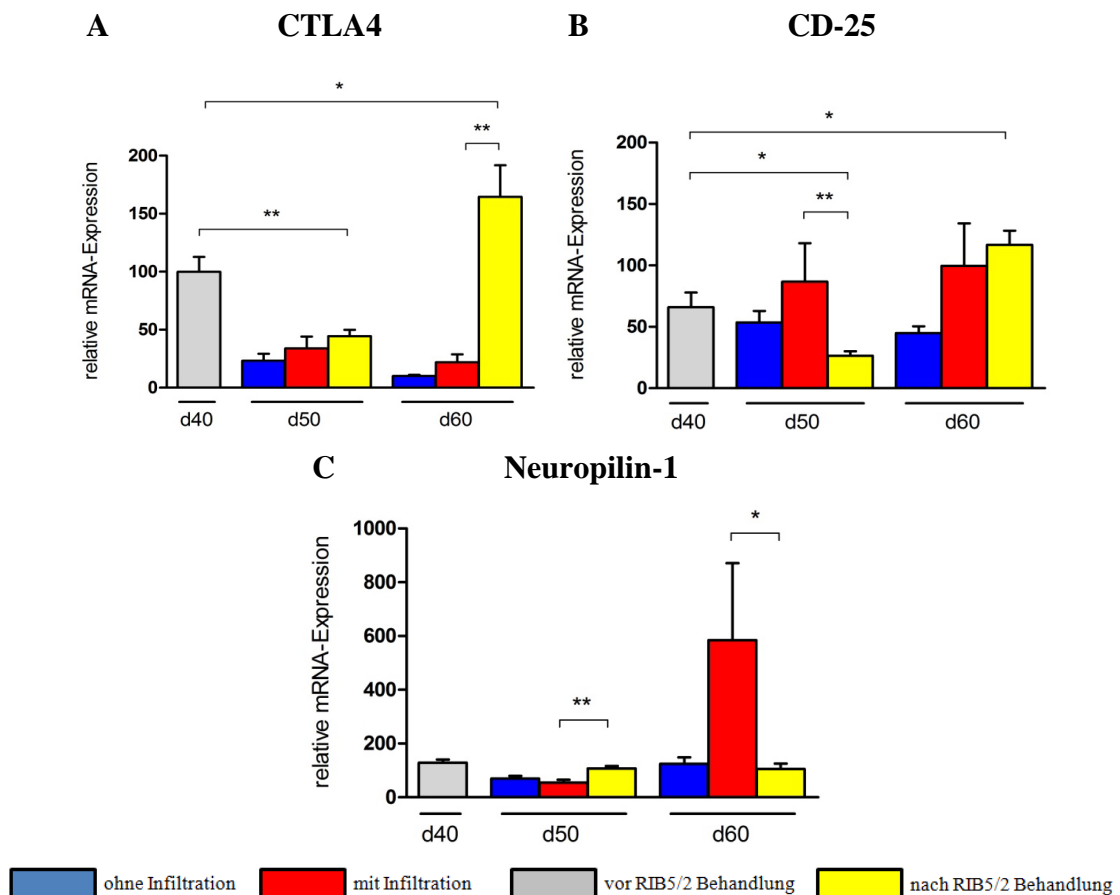


Abbildung 31: Relative mRNA-Expression von T-Zellmarkern in RIB5/2 Antikörper behandelter LEW.1AR1-*iddm* Ratten. (A) *CTLA4*, (B) *CD-25* und (C) *Neuropilin-1* zeigen Expressionsveränderung der PBMCs in Tieren mit Infiltrationen (rot), in nicht infiltrierten Tieren (blau) im Vergleich zu Tieren vor RIB5/2 Antikörperbehandlung (grau) und nach RIB5/2 Antikörper Behandlung (gelb). Eine Analyse erfolgte zu den Zeitpunkten 40, 50 und 60 Tagen. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.10.4. Regulatorische Gene *TGF- β* , *FoxP3* und *L-Selektin*

Die Genexpression des regulatorischen Gens *TGF- β* zeigte, dass die RIB5/2 Antikörper behandelten Tiere zum Zeitpunkt 50 Tage ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau (67 ± 11 vs. 41 ± 2) aufweisen als die 40 Tage alten, unbehandelten Kontrolltiere. Zum späten Zeitpunkt 60 Tage zeigte sich, dass das Genexpressionsniveau von *TGF- β* in RIB5/2 behandelten Tieren

signifikant höhere Expressionslevel (52 ± 10 vs. 95 ± 10) aufwies als infiltrierte Tiere des gleichen Zeitpunktes (Abb. 32 A). Das regulatorische Gen *FoxP3* wird zum Zeitpunkt 50 Tage signifikant niedriger (87 ± 12 vs. 33 ± 5) und zum Zeitpunkt 60 Tage signifikant höher (87 ± 12 vs. 146 ± 14) in RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren exprimiert als in den unbehandelten Vergleichstieren an Tag 40. Zusätzlich wiesen die RIB5/2 Antikörper behandelten Tiere ein signifikant niedrigeres (70 ± 16 vs. 33 ± 5) Expressionsniveau des Gens *FoxP3* an Tag 50 und ein signifikant höheres (64 ± 14 vs. 146 ± 14) Expressionsniveau an Tag 60 im Vergleich zu infiltrierten Tieren des gleichen Zeitpunktes auf (Abb. 32 B). Das Genexpressionlevel des Adhäsionsmoleküls *L-Selektin* war zum Zeitpunkt 50 Tage, in RIB5/2 Antikörper behandelten Tieren signifikant niedriger (63 ± 11 vs. 34 ± 4) und mit 60 Tagen signifikant höher (63 ± 11 vs. 118 ± 13) als in den unbehandelten Kontrollen zum Zeitpunkt 40 Tage. Desweiteren zeigte sich zum Zeitpunkt 60 Tage ein signifikant höheres *L-Selektin*-Genexpressionsniveau (24 ± 4 vs. 118 ± 13) nach RIB5/2 Behandlung als in den infiltrierten Tieren zur gleichen Zeit (Abb. 32 C).

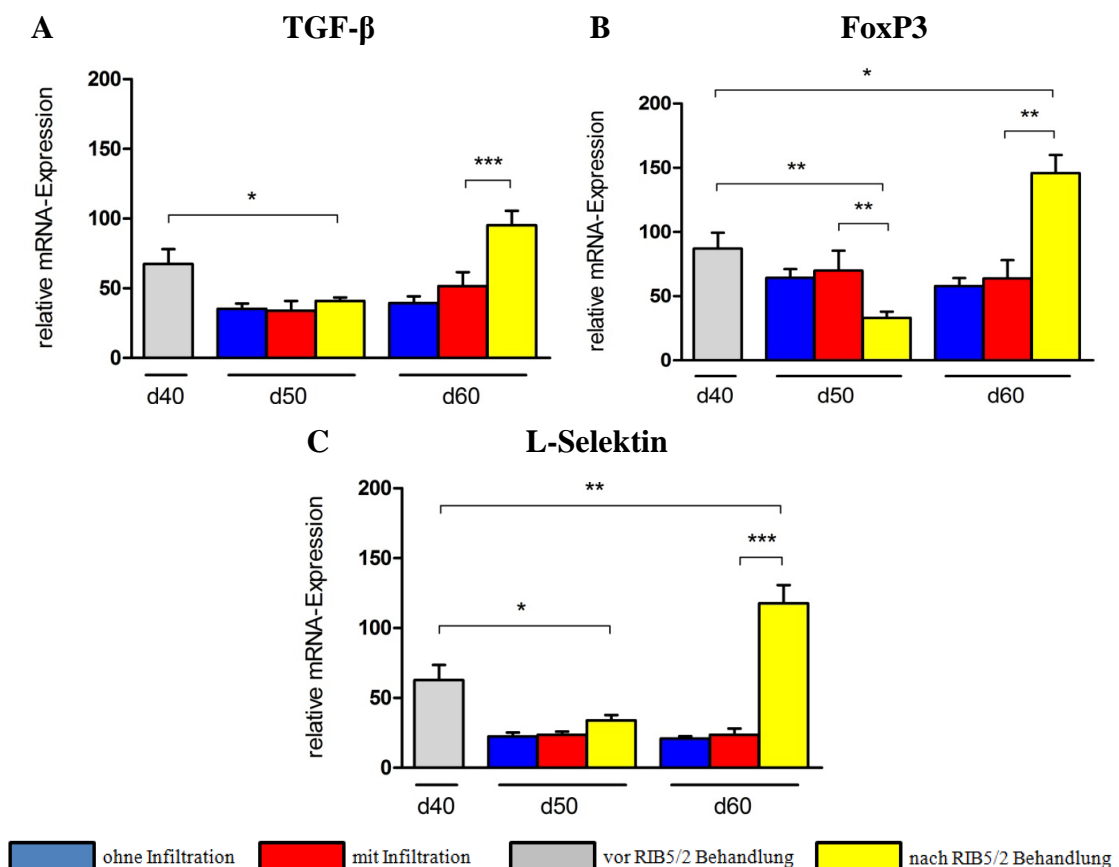


Abbildung 32: Relative mRNA-Expression regulatorischer Gene von RIB5/2 Antikörper behandelter LEW.1AR1-*iddm* Ratten. (A) *TGF- β* , (B) *FoxP3* und (C) *L-Selektin* zeigten Genexpressionsveränderung in den PBMCs von Tieren mit Infiltrationen (rot), in nicht infiltrierte Tieren (blau) im Vergleich zu Tieren vor RIB5/2 Antikörperbehandlung (grau) und nach RIB5/2 Antikörperbehandlung (gelb). Eine Analyse erfolgte zu den Zeitpunkten 40, 50 und 60 Tage. Eine Normalisierung wurde gegen GAPDH durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3.11. Decision-Tree Analyse

Die Decision-Tree Analyse ergab für die Zeitpunkte 40, 45, 50, 55 und 60 Tage jeweils unterschiedliche Entscheidungsbäume in Abhängigkeit der Expressionslevel der unterschiedlichen Marker. Der zuvor festgestellte Infiltrationsstatus bildete die Grundlage für die Klassifizierung der Daten im Entscheidungsbaummodell.

Die folgenden Entscheidungsbäume zeigen die entsprechenden Biomarker und ihre Expressionslevel welche einen prädiktiven Charakter für den Infiltrationsprozess des Pankreas haben und im späteren zu einem Diabetes führen würden. Zusätzlich wurde der prozentuale Wert der Prädiktionseffizienz durch den entsprechenden Entscheidungsbaum ausgegeben.

In der Entscheidungsbaumanalyse wurden neben den einflussreichsten Markern zur Klassifizierung auch die nachfolgenden Marker in abstufer Reihenfolge dargestellt. Für die Analyse wurde jeweils der stärkste prädiktive Biomarker aus der nachfolgenden Analyse eliminiert um die abstufer Reihenfolge zu erhalten. Diese abstufer Reihenfolge wurde bis zur letzten Möglichkeit zur Erstellung eines Baumes durchgeführt. Das ergab eine Steigerung der Klassifizierungsmöglichkeit von Tieren die nachweislich Infiltrationen im Pankreas aufwiesen, jedoch nicht entscheidungsbaumspezifische Genexpressionslevel aufwiesen.

Abschließend erstellte sich dann ein Gesamtbild der relevanten Gene des Infiltrationsprozesses zu spezifischen Zeitpunkten.

3.11.1. Decision-Tree zum Zeitpunkt 40 Tage

Das proinflammatorische Zytokin *IL-1 β* hatte zum Zeitpunkt 40 Tage den stärksten prädiktiven Charakter für den Infiltrationsprozess im LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell.

Das mathematische Modell besagte, dass eine erhöhte Genexpression des proinflammatorischen Zytokins *IL-1 β* (> 14843) zu Infiltrationen und im späteren Verlauf zu einem Diabetes führen würde. Im Falle einer geringeren Genexpression von *IL-1 β* (< 14843) würden keine Infiltrationen und auch kein Diabetes auftreten (Abb. 33). Innerhalb der Analyse konnte von insgesamt 37 untersuchten LEW.1AR1-*iddm* Tieren 29 Ratten richtig in den Baum integriert werden und somit die sich daraus ergebende prädiktive Effizienz des Entscheidungsbaumes mit 79 % berechnet wurde.

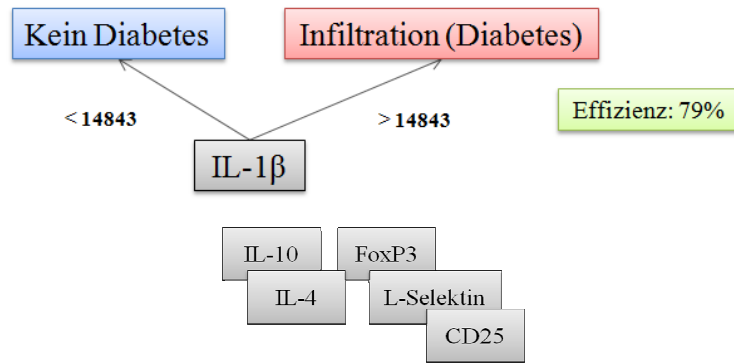


Abbildung 33: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse des Zeitpunkts 40 Tage in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Unter Angabe des zu GAPDH normalisierten Schwellenwertes der Genexpression von IL-1 β zeigt sich eine Prädiktionseffizienz von 79 % zu einer Infiltration (Diabetes) oder keinem Diabetes. Die Gene für *IL-10* und *IL-4* sowie *FoxP3*, *L-Selektin* und *CD-25* zeigten als Folgemarker eine abstufenden Rangfolge bei Bewertung der Infiltrationsrelevanz.

3.11.2. Decision-Tree zum Zeitpunkt 45 Tage

Im Entscheidungsbaumes zum Zeitpunkt 45 Tage konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte relative Genexpression der proinflammatorische Zytokine *IL-1 β* (> 1899) in Kombination mit einer reduzierten Expression von *TNF α* (< 2489) zu einem Diabetes führen würde. Zusätzlich eröffnete sich innerhalb des Entscheidungsbaumes eine zweite Möglichkeit zur Entstehung eines Diabetes mellitus, wenn die relative Genexpression von *IL-1 β* (< 11) auf einem sehr niedrigen Niveau verbleibt. Geringere Expressionslevel von *IL-1 β* (< 1899) und *TNF α* (< 2489) führen prädiktiv zu keinem Diabetes (Abb. 34). Innerhalb der Analyse konnten insgesamt 22 untersuchte LEW.1AR1-*iddm* Tiere richtig in den Baum integriert werden und die sich daraus ergebende prädiktive Effizienz des Entscheidungsbaumes wurde mit 100 % berechnet.

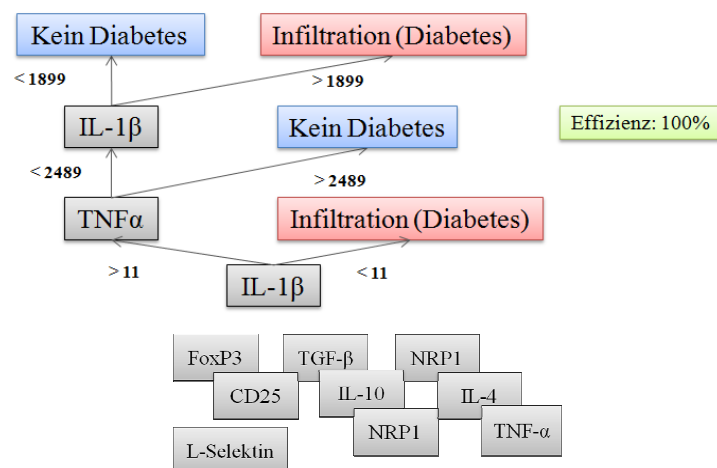


Abbildung 34: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse des Zeitpunkts 45 Tage in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Unter Angabe des zu GAPDH normalisierten Schwellenwertes der Genexpression von *IL-1 β* und *TNF α* welche mit einer Prädiktionseffizienz von 100 % zu einer Infiltration (Diabetes) oder keinem Diabetes führen würden.

3.11.3. Decision-Tree Analyse Zeitpunkt 50 Tage

Innerhalb der Decision-Tree Analyse zum Zeitpunkt 50 Tage konnte gezeigt werden, dass nur eine erhöhte Genexpression des T-Zellterminationssignals *CTLA4* (> 345) in Kombination mit einer reduzierten Genexpression des T-Zellmarker *CD-25* (< 3999) zu Infiltrationen und im späteren zu einem Diabetes führen würde. Eine reduzierte Expression von *CTLA4* (< 345) oder eine erhöhte Expression von *CD-25* (> 3999) hatte keine prädiktive Relevanz für die Entstehung eines Diabetes (Abb. 35). Innerhalb der Analyse konnten von insgesamt 16 untersuchten LEW.1AR1-*iddm* Tieren 15 Ratten richtig in den Baum integriert werden und die sich daraus ergebende prädiktive Effizienz des Entscheidungsbaumes wurde mit 94 % berechnet.

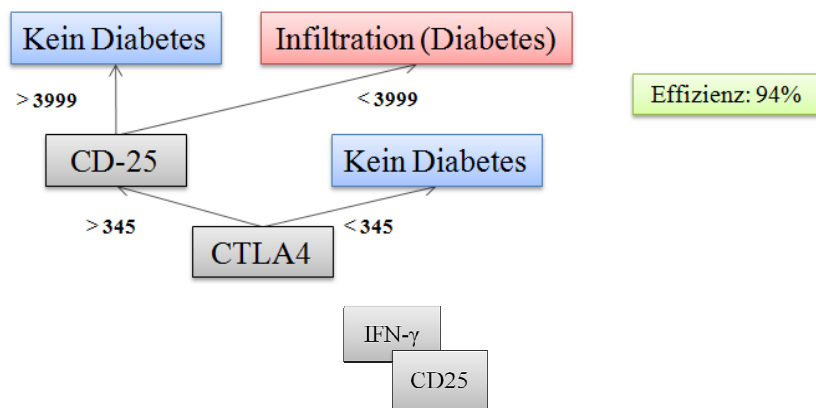


Abbildung 35: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse des Zeitpunkts 50 Tage in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Unter Angabe des zu GAPDH normalisierten Schwellenwertes die Genexpression von *CTLA4* und *CD-25* welche mit einer Prädiktionseffizienz von 94 % zu einer Infiltration (Diabetes) oder keinem Diabetes führen würde.

3.11.4. Decision-Tree Analyse Zeitpunkt 55 Tage

Die Decision-Tree Analyse zum Zeitpunkt 55 Tage ergab, dass eine reduzierte Genexpression des T-Zellmarkers *Neuropilin-1* (< 7990) in Kombination mit einer erhöhten Genexpression des proinflammatorischen Zytokins *IL-1 β* (> 4809) zu Infiltrationen und im späteren zu einem Diabetes mellitus führen würde (Abb. 36). Zusätzlich ergab die Berechnung der Decision-Tree Analyse, dass allein eine erhöhte relative Genexpression des T-Zellmarkers *Neuropilin-1* (> 7990) einen prädiktiven Charakter für den Infiltrationsprozess des Pankreas zum Zeitpunkt 55 Tage hat. Die Analyse zeigte, dass von insgesamt 15 untersuchten LEW.1AR1-*iddm* Tieren alle korrekt in den Entscheidungsbaum integriert werden konnten und die sich daraus ergebende prädiktive Effizienz des Entscheidungsbaumes wurde mit 100 % berechnet.

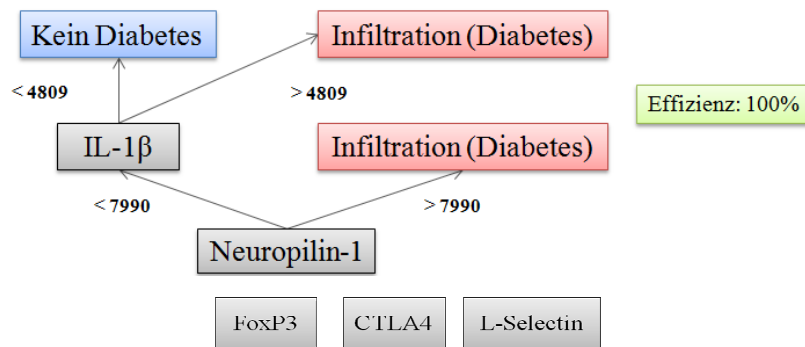


Abbildung 36: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse des Zeitpunkts 55 Tage in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Unter Angabe des zu GAPDH normalisierten Schwellenwertes zeigte die Genexpression von *Neuropilin-1* und *IL-1β*, dass eine entsprechende Expression mit einer Prädiktionseffizienz von 100 % zu einer Infiltration (Diabetes) oder keinem Diabetes führen würde.

3.11.5. Decision-Tree Analyse zum Zeitpunkt 60 Tage

Die Berechnung des Entscheidungsbaumes zum Zeitpunkt 60 Tage zeigte, dass eine erhöhte relative Expression des antiinflammatorischen Zytokins *IL-10* (> 2843) einen prädiktiven Charakter für den Infiltrationsprozess und einen folgenden Diabetes bei LEW.1AR1-*iddm* Tieren hat (Abb. 37). Innerhalb der Analyse konnten von insgesamt 16 untersuchten LEW.1AR1-*iddm* Tieren 13 Ratten korrekt in den Baum integriert werden und die sich daraus ergebende prädiktive Effizienz des Entscheidungsbaumes wurde mit 81 % berechnet.

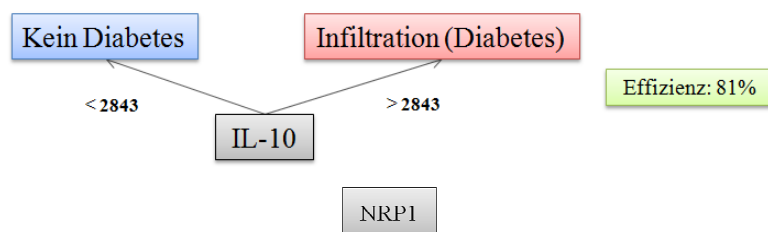


Abbildung 37: Genexpressionsbasierende Decision-Treeanalyse des Zeitpunkts 60 Tage in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Unter Angabe des zu GAPDH normalisierten Schwellenwertes der Genexpression von *IL-10*, welchen mit einer Prädiktionseffizienz von 81 % zu einer Infiltration (Diabetes) oder kein Diabetes führen kann.

3.11.6. Rangliste relevanter Biomarker nach Decision-Treeanalyse

Die Ergebnisse der Rangliste der infiltrationsrelevanten Biomarker resultiert aus einer weiterführenden Berechnung der Decision-Tree Analysen. Dafür wurden in jeder aufbauenden Analyse der stärkste Marker der vorangegangenen Analyse entfernt und ein neuer Entscheidungsbaum generiert. Daraus ergab sich aus den ursprünglich 11 gewählten Genen eine Rangfolge im Bezug auf die biologische Relevanz an einer Infiltration zu einem bestimmten Zeitpunkt im LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell beteiligt zu sein. In der Tabelle (Abb. 38) ist die Relevanz der Gene für eine Infiltration mit Rang (Rang 1-5) zu bestimmten Zeitpunkten (40-60

Tage) dargestellt. Dabei sind stark relevante Gene extra hervorgehoben worden. Es stellte sich heraus dass, zum Zeitpunkt 40 Tage, *IL-1 β* , *IL-10*, *FoxP3* und mit abgestufter Relevanz *L-Selektin*, *CD25* und *IL-4* infiltrationsrelevante Biomarker sind. Im Alter von 45 Tagen zeigten sich primär *IL-1 β* , *FoxP3*, *TGF- β* , *NRP-1*, *L-Selektin* und sekundär *TNF- α* , *CD-25*, *IL-10*, *NRP-1*, *L-Selektin* und *IL-4* als entscheidende Gene die an Infiltrationen beteiligt sind. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigten sich im Alter von 50 Tagen *CTLA4* und *INF- γ* in Kombination mit *CD-25* in auffälliger Expression bei infiltrierten Tieren. Die Expression der Gene *NRP-1*, *FoxP3*, *CTLA4*, *L-Selektin* und weniger *IL-1 β* spielten zum Zeitpunkt 55 Tage eine entscheidende Rolle in infiltrierten Tieren. In der finalen Infiltrationsphase an Tag 60 konnte die Gene *IL-10* und *NRP-1* mit erhöhter Genexpression in infiltrierten Tieren nachgewiesen werden.

Alter	Rang 1	Rang 2	Rang 3	Rang 4	Rang 5
40d	<i>IL-1β</i> ↑	<i>IL-10</i> ↑ <i>IL-4</i> ↓	<i>FoxP3</i> ↑ <i>L-Sel1</i> ↓↑, <i>CD-25</i> ↑, <i>IL-4</i> ↓	-	-
45d	<i>IL-1β</i> ↑ <i>TNF-α</i> ↓	<i>FoxP3</i> ↓ <i>CD-25</i> ↑	<i>TGF-β</i> ↓ <i>IL-10</i> ↓, <i>NRP-1</i> ↑	<i>NRP-1</i> ↓ <i>IL-4</i> ↑, <i>TNF-α</i> ↑, <i>L-Sel1</i> ↓	<i>L-Sel1</i> ↓ <i>CD-25</i> ↑
50d	<i>CTLA4</i> ↑ <i>CD-25</i> ↓	<i>IFN-γ</i> ↑ <i>CD-25</i> ↓	-	-	-
55d	<i>NRP-1</i> ↑ <i>IL-1β</i> ↑	<i>FoxP3</i> ↑	<i>CTLA4</i> ↑	<i>L-Sel1</i> ↑	-
60d	<i>IL-10</i> ↑	<i>NRP-1</i> ↑	-	-	-

Abbildung 38: Rangliste infiltrationsrelevanter Biomarker. Diese Abbildung spiegelt eine Rangfolge der infiltrationsrelevanten Biomarker wider, welche basierend auf der Entscheidungsbaumanalyse der höchste Prädiktionwert in absteigender Reihenfolge zugeordnet wurde. Bei infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Ratten konnte für Tag 40 das proinflammatorische Zytokin *IL-1 β* seinen stärksten Einfluss auf die Entwicklung einer Infiltration zeigen. Nachfolgend erwies sich *IL-10* in Kombination mit *IL-4* als entscheidend für Infiltrationen an Tag 40. Desweiteren konnte für *FoxP3* in Kombination mit *L-Selektin*, *CD25* und *IL-4* ein prädiktiver Wert hinsichtlich der Infiltrationen an Tag 40 zugeordnet werden. Ob für eine Vorhersage nach dem Entscheidungsbaummodell eine erhöhte (↑) oder erniedrigte (↓) Expression entscheidet wurde in der Tabelle mit entsprechenden Pfeilen markiert.

3.12. Biologisches Netzwerk zum Zeitpunkt 40 Tage

Die biologischen Netzwerke dienen der Visualisierung der Beziehungen der Gene zueinander auf Basis verschiedener Regulationsmechanismen. Das Netzwerk bildet sich aufgrund der Assoziationen der Gene untereinander, je stärker die Gen-Gen Interaktion sind desto dichter finden sich die benachbarten Gene zusammen. Das folgende biologische Netzwerk (Abb. 39) wurde für den spezifischen Zeitpunkt 40 Tage gebildet.

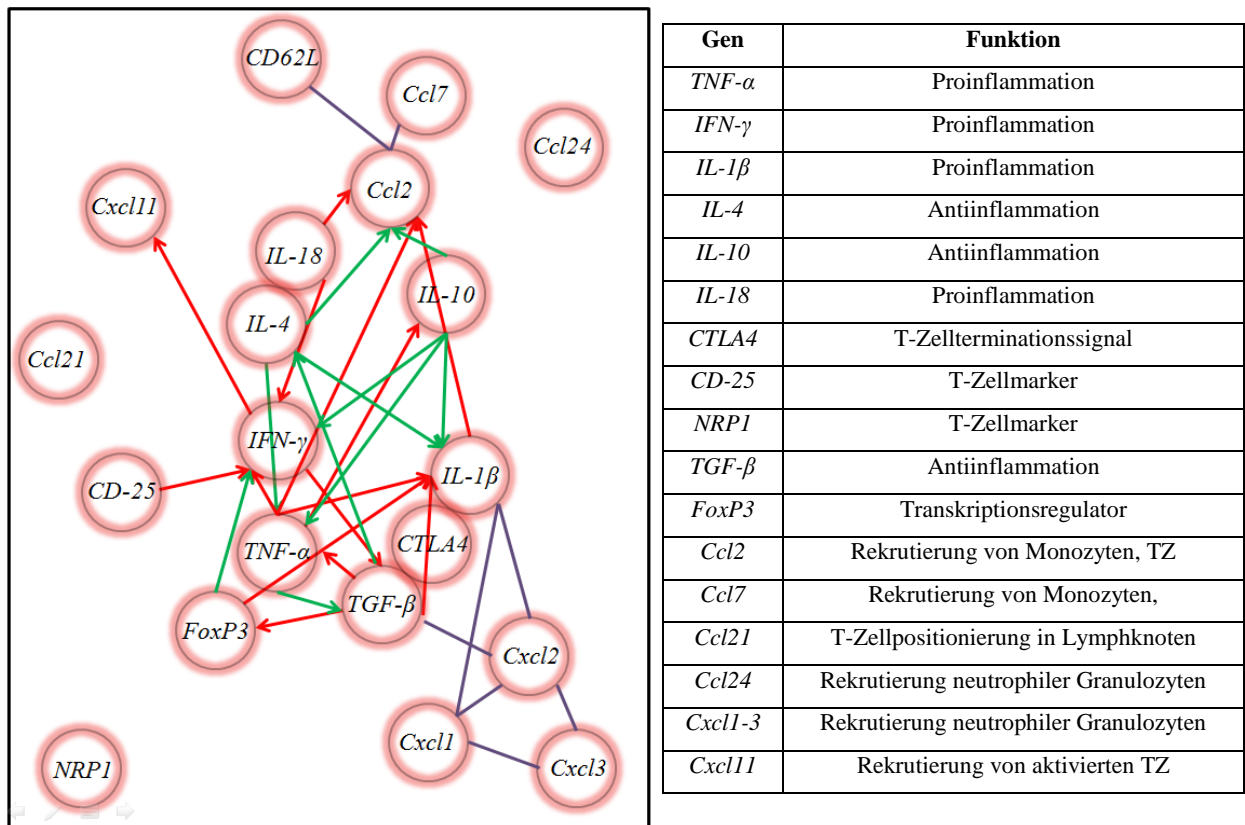


Abbildung 39: Biologisches Netzwerk auffällig exprimierter Gene in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Tieren des Zeitpunktes 40 Tage. Die regulatorischen Beziehungen der Gene (hochregulierte Gene in roten Kreisen) untereinander werden durch Pfeile mit entsprechender Richtung dargestellt. Hochregulation/Aktivierung (roter Pfeil), Runterregulation/Inhibierung (grüner Pfeil) und Coexpression (lila Verbindung).

Hierfür wurden die einzelnen proinflammatorischen Zytokine (*TNF- α* , *INF- γ* , *IL-1 β*), antiinflammatorischen Zytokine (*IL-4*, *IL-10*), T-Zellmarkergene (*CTLA4*, *IL2RA* (*CD-25*), *NRPI*) und die regulatorischen Gene (*TGF- β* , *FoxP3*, *L-Selektin*) mit den entscheidend regulierten Genen der Array-Analysen (*Ccl2*, *Ccl7*, *Ccl21*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Cxcl11*, *IL-18*) in Verbindung gesetzt. Das entstandene Netzwerk zeigt eine komplexe Verknüpfung aller vorhandenen Gengruppen (Zytokine, Chemokine, T-Zellmarker- und regulatorische Gene), welche zum Zeitpunkt 40 Tage auffallend höher reguliert und in der Peripherie coexprimiert wurden.

3.13. Biologisches Netzwerk zum Zeitpunkt 50 Tage

Das nachfolgende biologische Netzwerk wurde für den spezifischen Zeitpunkt 50 Tage erstellt. Zu diesem Zeitpunkt ergibt sich ein Bild aus hochregulierten und herabregulierten Genen mit unterschiedlichen Genexpressionsniveaus (Abb. 40).

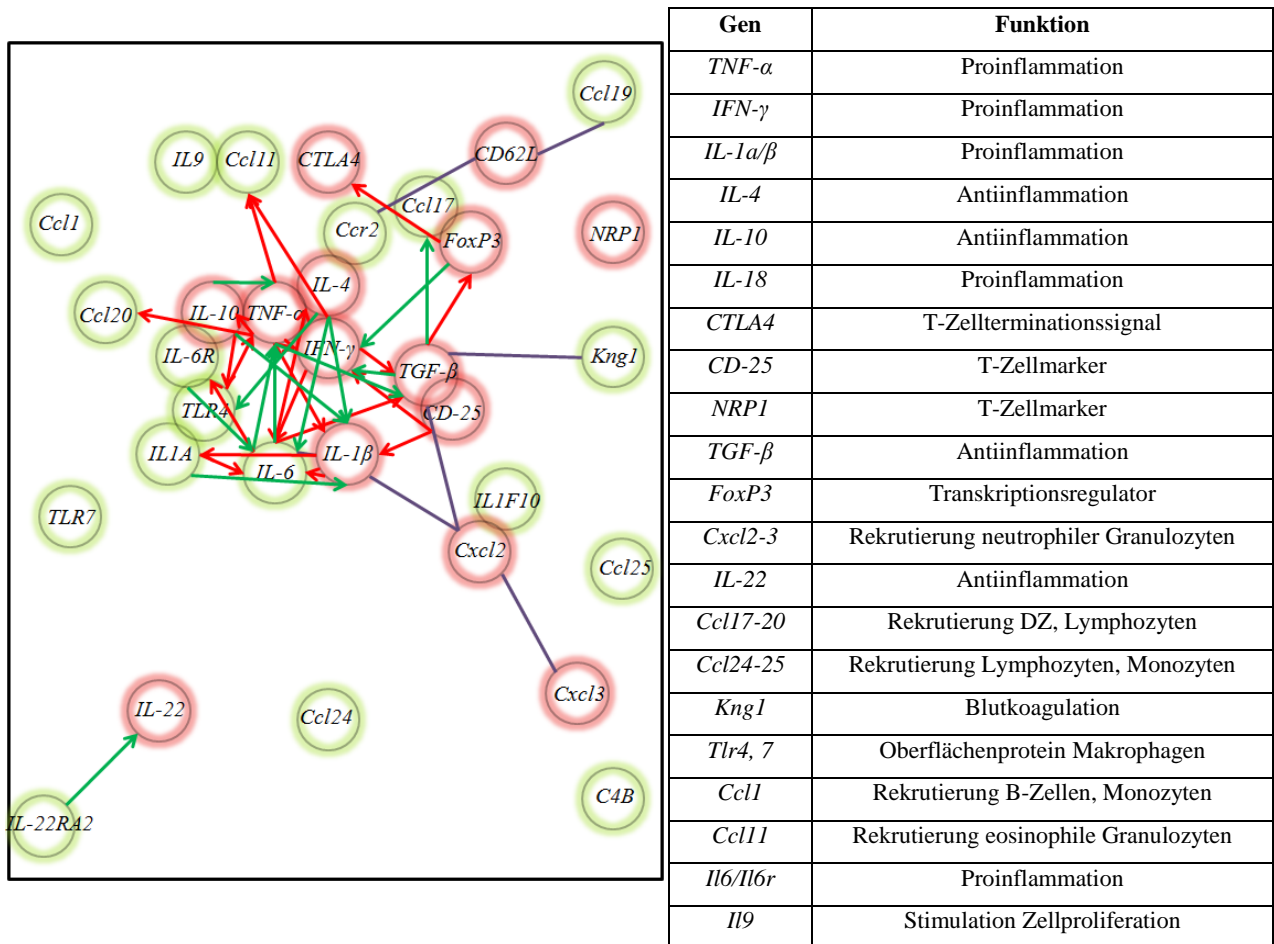


Abbildung 40: Biologisches Netzwerk auffällig exprimierter Gene in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten zum Zeitpunkte 50 Tage. Die Beziehungen der Gene (roter Kreise-stark exprimiert in infiltrierten Tieren, grüne Kreise-geringer exprimiert in infiltrierten Tieren) untereinander werden durch Pfeile mit entsprechender Richtung dargestellt. Hochregulation (rot), Inhibition (grün) und Coexpression (lila).

Die Gene proinflammatorischen- (*TNF-α*, *INF-γ*, *IL-1β*), antiinflammatorischen Zytokine (*IL-4*, *IL-10*), T-Zellmarker (*CTLA4*, *IL2RA* (*CD-25*), *NRP1*) und die regulatorischen Gene (*TGF-β*, *FoxP3*, *L-Selektin*) mit den regulierten Genen der Array-Analysen (*C4b*, *Ccl1*, *Ccl11*, *Ccl17*, *Ccl19*, *Ccl20*, *Ccl24*, *Ccl25*, *Ccr2*, *IL-1a*, *IL-1b*, *IL-1f10*, *IL-22ra2*, *IL-6*, *IL-6r*, *IL-9*, *Kng1*, *Tlr4*, *Tlr7*) wurden zueinander in Verbindung gesetzt. Zu 50 Tagen zeigte sich eine Inhibition der aufgeführten Chemokine, Ausnahme sind hochregulierten Zytokine *Cxcl2*, *Cxcl3* und *IL-18*. Es zeigte sich, dass Gene die zentral und eng zueinander lokalisiert sind stärker exprimiert werden. In der Peripherie angeordnete Gene werden stärker durch Coexpressionsprozesse reguliert.

3.14. Biologisches Netzwerk zum Zeitpunkt 60 Tage

Das nachfolgende biologische Netzwerk wurde für den spezifischen Zeitpunkt 60 Tage erstellt (Abb. 41).

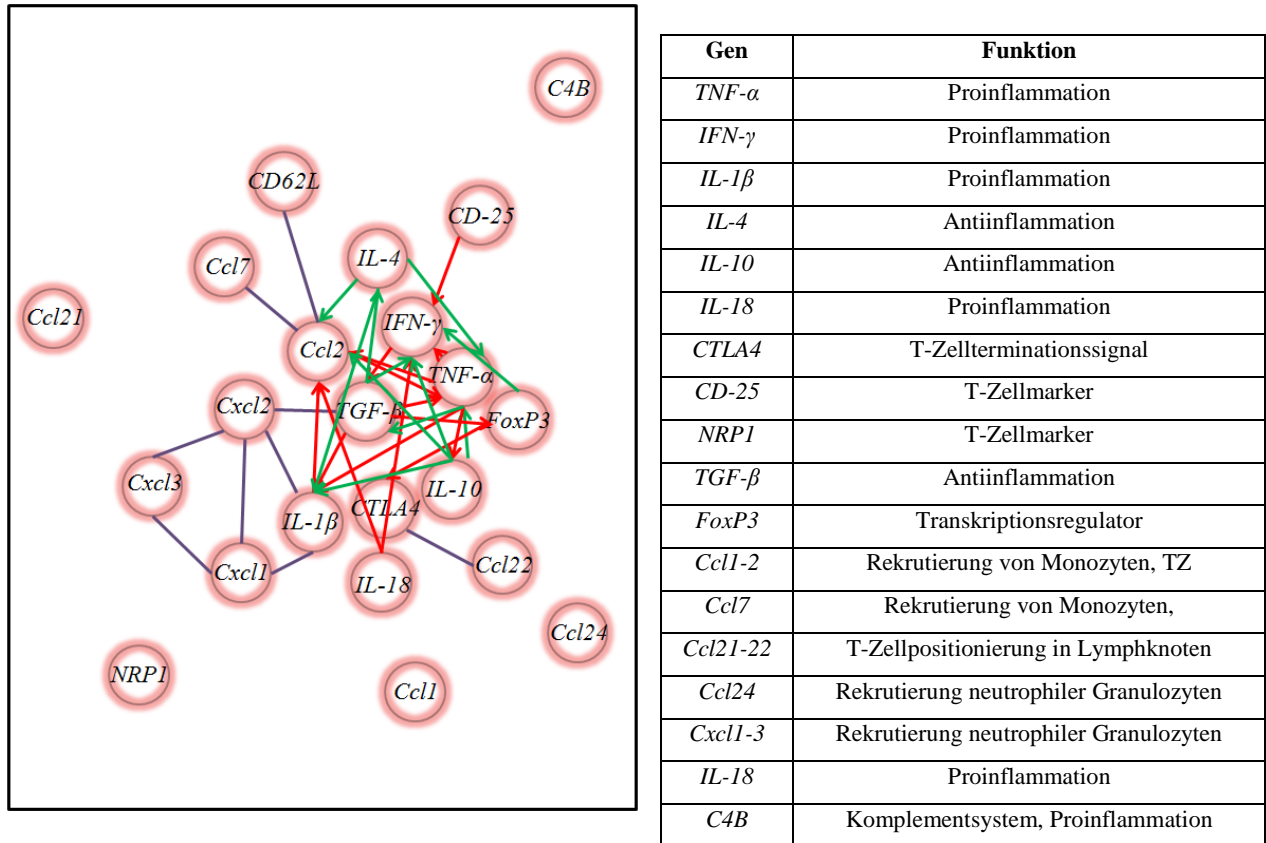


Abbildung 38: Biologisches Netzwerk auffällig exprimierter Gene in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Tieren des Zeitpunkt 60 Tage. Die regulatorischen Beziehungen der Gene (rote Kreise- hochregulierte Gene) untereinander werden durch Pfeile mit entsprechender Richtung dargestellt. Hochregulation/Aktivierung (roter Pfeil), Runterregulation/Inhibierung (grüner Pfeil) und Coexpression (lila Pfeil).

Die Gene der einzelnen proinflammatorischen Zytokine (*TNF-α*, *INF-γ*, *IL-1β*), antiinflammatorischen Zytokine (*IL-4*, *IL-10*), T-Zellmarkergene (*CTLA4*, *IL2RA* (*CD-25*), *NRPI*) und die regulatorischen Gene (*TGF-β*, *FoxP3*, *L-Selektin*) mit den entscheidend regulierten Genen der Array-Analysen (*C4B*, *Ccl1*, *Ccl2*, *Ccl21*, *Ccl22*, *Ccl24*, *Ccl7*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *IL-18*) wurden in Verbindung gesetzt. Der Zeitpunkt 60 Tage zeigte eine Hochregulation der aufgeführten Chemokine. Die Struktur des Netzwerkes zeigte, dass die regulierten Gene nicht sehr eng zueinander lokalisiert waren. Sowohl die Coexpression als auch die Hoch- und Runterregulation der Gene beschränkte sich auf einige zentral angeordnete Zytokingene und nur wenige Chemokine.

4. Diskussion

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) ist eine Autoimmunerkrankung bei der es zur Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas kommt. Die Ursache der Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen ergibt sich multifaktoriell aus dem Zusammenspiel zwischen der Betazelle, antigenpräsentierenden Zellen, autoaggressiven T-Zellen und Umweltfaktoren wie bestimmte Nahrungsinhaltsstoffe und Virusinfektionen [132].

Die von uns genutzte LEW.1AR1-*iddm* Ratte ist ein Tiermodell des T1DM. Bei den Tieren tritt die Inselinfiltration fokussiert zwischen dem 40. und 60. Lebensstag auf und führt aufgrund der progressiven Betazellzerstörung zu einem klinisch manifesten Diabetes [51, 54]. Das LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell weist keine geschlechtsspezifische Diabetesinzidenz (NOD-Maus), keine Immunzellinfiltrate in extrapancreatischen Geweben (KDP-Ratte und NOD-Maus) und keine Lymphopenie (BB-Ratte) sondern ein vollentwickeltes Immunsystem mit unveränderter Population von B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen auf [51, 53, 54, 64].

4.1. LEW.1AR1-*iddm* Ratten-ein Tiermodell zur Beschreibung des Prädiabetes

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass schon im Alter von 40 Tagen die ersten Infiltrationen im Pankreas durch eine H&E Färbung nachweisbar waren, obwohl bei allen untersuchten Tieren ein normoglykämischer Blutglukosewert ($< 7,8$ mmol/l) messbar war. Die Infiltrationsrate zeigte im zeitlichen Verlauf von 40 bis 60 Tagen, dass mehr als die Hälfte der Tiere zum Zeitpunkt 55 Tage lymphozytäre Infiltrationen aufwiesen. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Infiltrationsrate mit 60 Tagen wieder auf ein niedrigeres Niveau absank. Die Abnahme der Infiltrationsrate zum Zeitpunkt 60 Tage ist eine Folge des vermehrt auftretenden Diabetes.

Bei der Betrachtung der gesamten Daten fällt auf, dass der Großteil der Tiere an Tag 55 Infiltrationen aufwies. Diese histologische Beobachtung korreliert mit den etablierten Analysen zum LEW.1AR1-*iddm* Tiermodell, da der Zeitpunkt der Diabetesmanifestation im Alter von 58 ± 2 Tagen liegt [51].

Desweiteren ist bereits beschrieben, dass die durch Autoimmunprozesse induzierte Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen und infolgedessen die Reduktion der Betazellmasse des Pankreas der Ausgangspunkt für die Entstehung des Typ 1 Diabetes ist [133-135].

Während dieser Arbeit zeigte eine Bestimmung der Betazellmasse, dass zu den Zeitpunkten 40, 50 und 60 Tagen die Tiere mit lymphozytären Infiltrationen des Pankreas signifikant niedrigere Betazellmassen aufwiesen als nicht infiltrierte Tiere des gleichen Zeitpunktes. Im zeitlichen Verlauf von 40 bis 60 Tagen ergab sich ein leichter Anstieg der Betazellmasse um 27 % bei infiltrierte Tieren und um 45 % bei nicht infiltrierte Tieren. Eine Erklärung für den Anstieg der Betazellmasse könnte ein kompensatorischer Effekt aus verschiedenen Faktoren sein. Dabei haben erhöhter Insulinbedarf infolge von Körperwachstum, niedrigerer Insulinsensitivität der Peripherie, beginnende Betazellzerstörung und regulatorische Signale (Glukagon, Insulin, Gastrin, Somatostatin) einen Einfluss auf die Betazellfunktion [136].

Bei der Analyse der Betazellmasse stellte sich heraus, dass nicht infiltrierte Tiere im Vergleich zu infiltrierte Tieren im Durchschnitt 5 bis 18 % mehr Inseln innerhalb des Pankreas aufwiesen, wobei es aber keine signifikanten Unterschiede in der durchschnittlichen Inselgröße beider Tiergruppen gab. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass trotz inflammatorischer Prozesse innerhalb des Pankreas noch eine Zunahme der Betazellmasse in geringem Maße stattfand. Eine mögliche Erklärung resultiert aus einer Studie, bei der Analysen an Mäusen, Ratten und Menschen ergeben haben, dass ein Anstieg der Betazellmasse durch Neogenese (Differenzierung aus Betazellvorläufern) und Selbstreplikation hervorgerufen wird. Dabei werden zerstörte Betazellen ersetzt, um den physiologischen Verlust zu kompensieren [135, 137].

Beim Menschen konnte in der frühen Kindheit ein rapider Anstieg der Betazellmasse durch selbstreplikative Aktivität beobachtet werden, welche im Alter von fünf Jahren nahezu abgeschlossen ist [134]. In einem Rattenmodell konnte jedoch eine erhöhte Rate der Selbstreplikation von Betazellen, wenn diese bereits neonatal durch Betazellzerstörung betroffen waren, keine voll funktionsfähige Betazellmasse generieren [135]. Innerhalb einer Humanstudie wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust von Betazellen im jungen Patienten einen höheren metabolischen Stress (kompensatorische Insulinproduktion, Immunantwort, höherer Blutglukosewert) in den verbleibenden Betazellen auslöst und es folglich wieder zu einem Anstieg der Betazellmasse kommt. Dieser Prozess hält dann nur solange an, bis es zu einer autoimmunen Zerstörung der proliferierenden Betazellen kommt [133]. Studien an Tiermodellen zeigten außerdem, dass externe Stimuli (Gastrin, EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)) eine leichte Regeneration der Betazellmasse bewirken können, welche auf die Aktivierung von Progenitor- oder Stammzellen zurückzuführen ist [135].

Folglich lässt sich schlussfolgern, dass trotz leichtem Anstieg der Betazellmasse während der Infiltrationsphase, eine vollständige Zerstörung der Betazellen abläuft und ohne eine entsprechende Intervention zu einem insulinpflichtigen Diabetes in diesem Tiermodell führt.

Zurzeit gibt es noch keine etablierte Behandlungsmethode, welche gezielt die Proliferation von Betazellen stimulieren und so eine obligate Insulinsubstitution neben der noch präsenten Autoimmunität verhindern [137].

4.2. Die inflammatorischen Prozesse spiegeln sich in der Korrelation zwischen Differentialblutbild und Genexpressionsmuster des peripheren Blutes wider

Mit Hilfe des Differentialblutbildes von infiltrierten und nicht infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Ratten wurden die Population von neutrophilen-, eosinophilen und basophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten ermittelt. Die Blutbilder der infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Ratten wiesen signifikant höhere Zellpopulationen für neutrophile Granulozyten (d40, d45, d50) und Monozyten (d40) auf. Eine Fehlinterpretation unserer immunologischen Daten, aufgrund von Infektionen, kann ausgeschlossen werden, da eine regelmäßige Kontrolle des Gesundheitszustandes nach FELASA Richtlinien erfolgte.

Die neutrophilen Granulozyten und Monozyten sind ein Bestandteil der unspezifischen aber auch der spezifischen zellulären Abwehr. Aus der Literatur ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten vermehrt in der Blutperipherie auftreten, wenn akute oder chronische Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Antigenreaktionen ausgelöst wurden. Makrophagen bzw. deren Vorläuferzellen, die Monozyten, sind an der Antigenpräsentation und Phagozytose körperfremder Strukturen beteiligt und verbleiben für 1 bis 3 Tage im peripheren Blut bevor sie ausdifferenzieren und die entzündeten Gewebe infiltrieren [138]. Der gemeinsame Vorläufer von Monozyten und neutrophile Granulozyten sind die hämatopoetischen Stammzellen, die unter Einfluss von Wachstumsfaktoren differenzieren, über die chemotaktische Stimulation aus dem Knochenmark emigrieren und in das entzündliche Gewebe immigrieren.

Die durch verschiedene Blutzellen (Makrophagen, T-Zellen, Granulozyten) sezernierten Chemokine sind kleine Zytokine oder Signalproteine die eine gerichtete Bewegung von Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten der Chemokine zum Ort der Entzündung bewirken. Mit Hilfe der PCR-Arrays des peripheren Blutes konnte zum Zeitpunkt von 40 Tagen eine 2 bis 8-fach höhere Genexpression der Chemokingene *Ccl2*, *Ccl7*, *Ccl21*, *Ccl24*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Cxcl11* nachgewiesen werden. Da die Chemokine *Ccl24*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und TNF eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten ausüben und speziell *Cxcl1* und *Cxcl2* die Emigration der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark fördern könnte hier ein direkter Zusammenhang zwischen der Genexpression und dem Vorkommen der Immunzellen im peripheren Blut bestehen [139].

Mit der erhöhten Genexpression von *Ccl2* und *Ccl7* zeigten sich zwei chemotaktisch relevante Chemokine für Monozyten im peripheren Blut der infiltrierten Tiere. Eine aktuelle Studie geht davon aus, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut und der Entwicklung von T1DM besteht. In dieser Studie konnten bei diabetischen Patienten vermehrt neutrophile Granulozyten im exokrinen Pankreas festgestellt werden [140].

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte signifikant hohen Populationen von neutrophilen Granulozyten aus der Peripherie in das Pankreas einwandern und so den inflammatorischen Prozess verstärken. Unterstützend wirkt hierbei der Fakt, dass sich im späteren zeitlichen Verlauf (d55, d60) trotz verstärkter Genexpression der mit Granulozyten assoziierten Chemokine, keine erhöhten Zellpopulationen von neutrophilen Granulozyten mehr im peripheren Blut nachweisen ließen und eine Abwanderung ins Pankreas nahe liegt.

Die durch zirkulierende Monozyten/Makrophagen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β bewirken wiederum in Monozyten und Endothelzellen die Produktion von Chemokinen (Cxc11-3, Ccl24, Ccl2, Ccl7), welche die Rekrutierung von weiteren Monozyten und neutrophilen Granulozyten hervorruft. Für das LEW.1AR1-*iddm* Tiermodell konnte eine signifikant erhöhte mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β zum selben Zeitpunkt (d40) in PBMCs der infiltrierten Tiere nachweisen. IFN- γ bewirkt eine Rückkopplung, bei der die Stimulation der sezernierenden Zellen durch IFN- γ erneut eine verstärkte Freisetzung von TNF- α und IL-1 β zur Folge hat und sich das inflammatorische Signal selbst verstärken kann. Das Zusammenspiel dieser Zytokine fördert weitere inflammatorische Prozesse und die Rekrutierung von Immunzellen.

Ein wichtiger Bestandteil der immunreaktiven Zellen, die für den Migrationsvorgang vom peripheren Blut durch die Gefäßwände in das entzündete Gewebe benötigt wird ist das Oberflächenmolekül L-Selektin. L-Selektin wird auf der Oberfläche der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gebildet und dient beim Eindringen durch die Endothelzellen in das Zielgewebe als Ankerprotein. Eine signifikant erhöhte mRNA-Expression konnte für L-Selektin in den PBMCs für den Zeitpunkt von 40 Tagen in infiltrierten Tieren nachgewiesen werden. In der Literatur wurde eine erhöhte Expression von L-Selektin mit T-Zellen in Verbindung gebracht die in der Blutbahn zirkulieren. Jedoch verringert sich die Expression von *L-Selektin* um 70 % nach Eintritt der exprimierenden Zellen in lymphoide Gewebe [141]. Daraus ergibt sich, dass eine hohe Expression von L-Selektin im peripheren Blut, die auch bei infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Tieren festgestellt wurde, ein Hinweis auf eine Entzündung sein kann und erst beim Eintritt in lymphoide Gewebe zu einer geringen Expression führt.

Während einer Entzündung wandern neutrophile Granulozyten und Monozyten (L-Selektin an der Oberfläche) entlang des lokalen Konzentrationsgradienten der Chemokine zwischen den Endothelzellen in Richtung der Inflammation. Dabei werden auch Proteasen ausgeschüttet die Teile der extrazellulären Matrix der Endothelzellen auflösen um ein leichteres Durchdringen der Immunzellen zum Ort der Entzündung zu ermöglichen.

Aus der Literatur geht hervor, dass eine mit den neutrophilen Granulozyten assoziierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dann verstärkend auf die fokale Zerstörung innerhalb des Pankreas wirkt [140, 142]. Daraus ergibt sich die Annahme, dass durch erhöhte Expression von Chemokinen und Zytokinen ein in der Peripherie entstandenes auslösendes Signal verstärkt und in das Pankreas verlagert werden kann. Diese Annahme wird durch die Analysen von Battaglia *et al.* unterstützt, die ebenfalls eine Abnahme der neutrophilen Granulozyten in der Peripherie und ein erhöhtes Vorkommen im Pankreas von humanen T1DM Patienten beobachtet hat. Daraufhin wurde von Battaglia *et al.* auch eine Wanderung der neutrophilen Granulozyten von der Peripherie in das Pankreas vermutet [140].

Aus der Literatur ergibt sich die Hypothese, dass das Pankreas ausgehend von den pankreas drainierenden Lymphknoten (PLN) durch Lymphozyten infiltriert wird [53]. Daraus ergibt sich, dass dem Infiltrationsvorgang des Pankreas zuerst eine Positionierung von Immunzellen in den Lymphknoten vorausläuft. Hierfür werden spezifische Chemokine (Ccl19, Ccl21) sezerniert, welche für die Positionierung von antigen-präsentierenden Zellen (APZs) in Lymphknoten verantwortlich sind. Letztendlich bewirkt die genetische Prädisposition dann ein gerichtetes Auswandern der Immunzellen in das Pankreas.

Mit Hilfe des PCR-Arrays konnte für das Gen *Ccl21* eine erhöhte Expression in PBMCs infiltrierter Tiere an Tag 40 nachgewiesen werden. *Ccl21* ist als Ligand für den sich auf B- und T-Lymphozyten und im Lymphknotengewebe befindenden Rezeptoren *Ccr7* beschrieben [143]. Eine Bindung von *Ccl21* bewirkt die gerichtete Migration von T-Zellen und hämatopoetischen Zellen in die Lymphknoten [144]. Zusätzlich konnten Leon *et al.* (2008) zeigen, dass L-Selektin und *Ccl2* notwendig sind für die Akkumulierung von Monozyten in den Lymphknoten [145].

Bezüglich der Akkumulierung von Immunzellen, konnte in den infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Tieren ein erhöhtes Genexpressionsniveau von *Ccl2* und *L-Selektin* in PBMCs und *L-Selektin* in PLNs für den Zeitpunkt von 40 Tagen in infiltrierten Tieren nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Jörns *et al.* (2004) zeigte zudem mit histologischen Analysen, dass vor allem T-Lymphozyten und Makrophagen in PLNs von diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten nachweisbar waren [54-57]. Die Beobachtungen von Jörns *et al.* (2004) unterstützen zusätzlich

die Vermutung und die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass die Pankreas infiltrierenden Zellen von den pankreas drainierenden Lymphknoten zu den Inselzellen auswandern.

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Auffälligkeiten die sich im Differentialblutbild der infiltrierten Tiere, zeigten mit einer signifikant höheren Monozyten- und neutrophile Granulozytenpopulation einhergehen. Weiterhin zeigte sich in den infiltrierten Tieren auch eine erhöhte Genexpression in der genannten Zellpopulation von Chemokinen und Zytokinen die die Vermutung einer Wanderung aus der Blutperipherie in die Lymphknoten unterstreicht.

4.3. Genexpressionsmuster von PBMCs und PLNs korrelieren in der prädiabetischen Phase

Ausgangspunkt der Untersuchung war die Frage, ob sich die verschiedenen Stadien der Autoimmunität im Genexpressionsprofil des peripheren Blutes (PBMCs) widerspiegeln. Zusätzlich sollte aufgrund der biologischen Bedeutung der Lymphknoten geklärt werden, ob sich das Genexpressionsprofil von PBMCs und pankreas drainierender Lymphknoten miteinander korrelieren lässt.

Die zu Beginn durchgeführte histologische Untersuchung des Pankreas mittels H&E- und T-Zellrezeptorfärbung diente vorrangig der Visualisierung möglicher mononukleäre Infiltrationen in den Langerhansschen Inseln der normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Tiere zu den verschiedenen Zeitpunkten von 40, 45, 50, 55 und 60 Tagen. Die Tiere wurden in Abhängigkeit von einer Infiltration in infiltrierte- und nicht infiltrierte Tiere eingeteilt.

Basierend auf den Genexpressionsanalysen von PBMCs und PLNs, konnten charakteristische Unterschiede zwischen infiltrierten- und nicht infiltrierten LEW.1AR1-*iddm* Ratten aufgedeckt werden. Das Ergebnis der Analyse ergab, dass an definierte Zeitpunkte gekoppelte Prozesse (Zellpopulationen, Genexpression, Infiltration, Betazellmasse) die sich von der Blutperipherie über die Lymphknoten in das Pankreas verlagerten. Das heißt, die Zellpopulationen der Monozyten und neutrophilen Granulozyten waren erst signifikant erhöht (40d, 45d, 50d) und fielen zu Tag 55 und 60 ab. Dieses Ergebnis unterstützt die zuvor erwähnte

Hypothese der Verschiebung in Richtung Pankreas. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich auch eine Verlagerung der signifikant regulierten Gene der PBMCs in Richtung der pankreas drainierenden Lymphknoten. Die Betazellmasse war in infiltrierten Tieren über den zeitlichen Verlauf signifikant niedriger als in nicht infiltrierten Tieren, jedoch waren die Blutglukosewerte unauffällig.

Die Hypothese der zeitpunktspezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils wurde mit Hilfe der einzelnen Taqman-Gensonden durch realtime-PCR aufgestellt und durch immunrelevante PCR-Arrays bestätigt.

Im Detail zeigte sich, dass zu Beginn des inflammatorischen Prozesses an Tag 40 ein Genexpressionsmuster bestehend aus pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, regulatorischen und T-Zellmarkern in PBMCs der Peripherie nachweisen ließ. Ein Vergleich der Genexpression von PLNs der LEW.1AR1-*iddm* Ratten zeigte, dass zum Zeitpunkt 40 Tage eine höhere Expression nur für CD-25 und L-Selektin in infiltrierten Tieren nachweisbar war. Aufgrund dessen, dass sämtliche inflammatorisch relevanten Marker und Chemokine die für die Rekrutierung von Immunzellen entscheidend sind in infiltrierten Tieren stark exprimiert werden, ist von einem allgemeinen Entzündungsvorgang in der Peripherie schon vor Diabetesmanifestation auszugehen.

Diese Beobachtung wird von Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen dahingehend unterstützt, dass vor allem pro- und antiinflammatorische Zytokine (*IL-1 β* , *IL-24*) [89] und für Chemotaxie relevante Gene (*Cxcl1-3*, *Ccl7* und *Ccl2*) [90] in human PBMCs von neudiagnostizierten T1DM Patienten überexprimiert werden [92]. Die antiinflammatorische Zytokine spielen dahingehend eine große Rolle, da der Körper eine intensive Gegenregulation innerhalb einer Entzündung durchführt um das Gleichgewicht wiederherzustellen und die Entzündungsprozesse einzuschränken. Der Zusammenhang zwischen Zytokinen und Chemokinen besteht darin, dass erst eine Kombination von TNF- α , IFN- γ und IL-1 β der aktivierten mononukleären Zellen zur Freisetzung von Chemokinen und stimulierenden Zytokinen und Rekrutierung von Immunzellen führt [21].

Infolgedessen wird unter Kontrolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT-1 die Expression von iNOS eingeleitet. Da iNOS einer verzögerten Regulation unterliegt kommt es zu einer langanhaltenden Expression, wobei hohe Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) [146] mit Sauerstoffradikalen zytotoxisch wirken und die Betazellapoptose auf indirektem Weg forcieren [81]. Die Daten der verschiedenen Arbeitsgruppen korrelieren mit bereits erzielten Ergebnissen von Jörns *et al.* (2005), die eine verstärkte Expression von *IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-4*, *IL-10* und *iNOS* mit Hilfe von *in-situ* Analysen in der prädiabetischen Phase verstärkt an Ratteninseln von LEW.1AR1-*iddm* aufgezeigt werden [53, 88].

Die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen lassen sich mit den von uns generierten Daten im Zusammenhang darstellen. Zuerst wird eine allgemeine Entzündungsreaktion induziert welche sich dann spezifisch und über die Zeit verstärkend gegen die Betazellen richtet.

Allerdings besteht der Vorteil unserer Analysen an PBMCs darin, zukünftige Daten anhand einer Blutprobe zu erheben ohne das Tier töten zu müssen.

Es konnte klar gezeigt werden, dass noch in der prädiabetischen Phase, welche durch proinflammatorische Prozesse gekennzeichnet ist, eine Gegenregulation durch antiinflammatorische Zytokine eingeleitet wird in Form einer hohen Expression von *IL-4*, *IL-10* und *TGF- β* .

Zur gleichen Zeit werden in der frühen Infiltrationsphase auch die regulatorischen Marker in den PBMCs infiltrierter Tiere verstärkt exprimiert. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden kann, dass eine starke Aktivierung des angeborenen Immunsystems zum prädiabetischen Zeitpunkt vorliegt und aufgrund der genetischen Prädisposition im Bereich des MHCs zu einem T1DM führt. In neueren Studien wurde beschrieben, dass Auffälligkeiten innerhalb der Populationen von Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und natürliche Killerzellen bei Patienten und Risikogruppen für T1DM bestehen. Man geht davon aus, dass Art, Ausmaß und die Dauer der Zellpopulationsanomalien bestimmt, ob ein T1DM entwickelt wird oder nicht [147].

Korrelierend mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, konnte auch durch andere Arbeitsgruppen aufgezeigt werden, dass die von Makrophagen stammenden Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 schon vermehrt in prädiabetischen- und in neudiagnostizierten diabetischen Patienten nachweisbar sind [26, 148].

Unsere Analysen, an PBMCs 50 Tage alten infiltrierten Tiere, zeigten noch einmal, wie zu Tag 40, eine signifikant erhöhte Zytokinexpression (*IFN- γ* , *IL-1 β* , *IL-10*). Dieses Signal verlagerte sich bis zur späten Infiltrationsphase in den PBMCs (d60) auf die Seite der regulatorischen Marker (*CTLA4*, *CD25*, *NRPI*). Dabei besteht die Funktion von IL-10 darin, die Synthese von IL-2 und $\text{IFN-}\gamma$ in Th1-Zellen, IL-1 , IL-6 , IL-8 , IL-12 , $\text{TNF-}\alpha$, GM-CSF in Monozyten/Makrophagen und die Bildung reaktiver Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (NO) zu unterdrücken. Als weiteres antiinflammatorisches Zytokin konnte IL-4 an humanen Monozyten nachgewiesen werden, das die Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 hemmt [149]. Dieser antiinflammatorische Mechanismus von IL-4 wird auf indirektem Weg induziert, indem verstärkt IL-1R (Interleukin-1 Rezeptor) Antagonisten oder lösliche TNF -Rezeptoren produziert werden [150].

Die geringere Anzahl von signifikant höher exprimierten Genen (*Cxcl2*, *Cxcl3*) ist auch innerhalb des PCR-Arrays zum Zeitpunkt 50 Tage bei infiltrierten Tieren aufgefallen. Der Nachweis verdeutlicht noch einmal die Gegenregulation in Folge eines Inflammationsprozesses.

Im Detail stellte sich bei unseren Analysen, die Expression antiinflammatorischer Zytokine und eine allgemeine Repression noch zuvor stark exprimierter Gene dar im zeitlichen Verlauf dar.

Dennoch zeigten die auch an Tag 50 stark exprimierten Chemokine *Cxcl2* und *Cxcl3*, verantwortlich für die chemotaktische Bewegung neutrophiler Granulozyten, eine Korrelation mit einer signifikant höheren Anzahl von im peripheren Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten. Allgemein betrachtet war der Zeitpunkt 50 Tage durch eine deutlich schwächere Genexpression der Chemokine und Zytokine in PBMCs infiltrierter Tiere gekennzeichnet.

Man weiß, dass die immunologischen Prozesse der Inflammation und Infiltration nicht generell gleichzeitig ablaufen. In Abhängigkeit von ihrer Konzentration treten die aktivierten Zellen, sezernierte Zytokine und Chemokine als Balance zueinander während einer Inflammation und deren Gegenregulation auf. Somit wird der Wechsel von Inflammation und Antiinflammation als dynamischer Prozess angesehen [151].

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass nur eine geringe Anzahl von Genexpressionsmarkern signifikant höher exprimiert wurde. Die Höhe des allgemeinen Genexpressionsniveau aller untersuchten Marker zum Zeitpunkt 50 Tage stieg in den PLNs jedoch stark an. Beim Vergleich zur Peripherie war in den PBMCs ein gleichzeitiger Abfall zu erkennen war (Abb. 42).

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von PLNs und PMBCs zeigt, dass an Tag 60 pro-, antiinflammatorische- und regulatorische Gene verstärkt in PLNs infiltrierter Tiere exprimiert werden. Zusätzlich wurde ein Absinken des generellen Genexpressionsniveaus in PLNs und ein weiterer Anstieg in den PBMCs (regulatorische Marker, Chemokine) zu Tag 60 beobachtet (Abb. 42).

Aus den gewonnenen Daten kann ein zeitabhängiges, auf Interdependenz beruhendes Genexpressionsniveau zwischen PMBCs und PLNs geschlussfolgert werden (Abb. 41). Eine ähnliche Form dieser gegenseitigen Abhängigkeit wurde für CD-4⁺ und CD-8⁺ T-Zellen beschrieben welche erst beim gemeinsamen Auftreten eine Expression von IFN- γ bewirken und dann einen Diabetes mellitus auslösen [85, 152].

Aufgrund der starken Expression von pro- und antiinflammatorische Zytokinen und regulatorischen Genen wird die Hypothese untermauert, dass das inflammatorische Signal der Peripherie in die PLNs verlagert und von dort aus die Entzündungsvorgänge im Pankreas induziert werden [55-57].

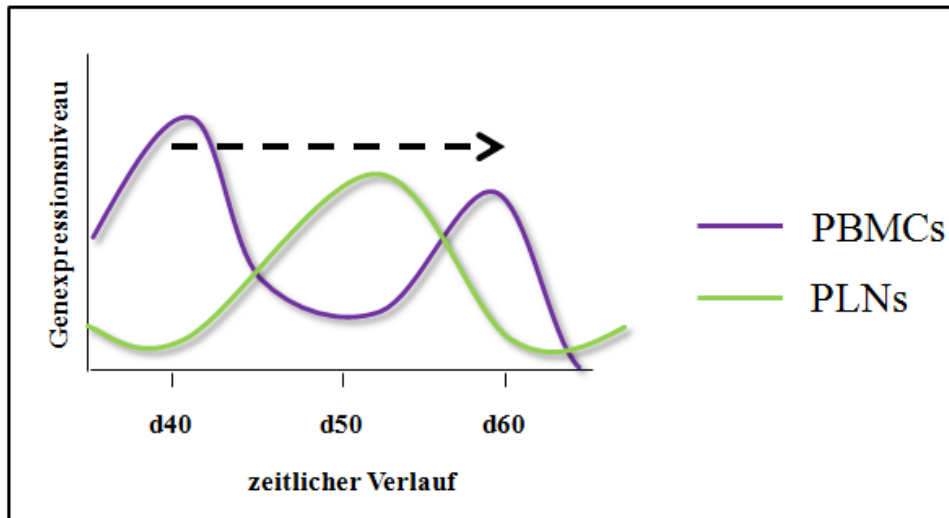


Abbildung 39: Genexpressionsniveau normoglykämischer LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Schematische Darstellung des Genexpressionsniveaus von PBMCs und PLNs im zeitlichen Verlauf von 40 bis 60 Tagen. Das alternierende Ansteigen des Genexpressionsniveaus erfolgt an zwei Zeitpunkten für PBMCs infiltrierter und nicht infiltrierter Tiere (d40, 60) und an einem zeitlichen versetzten Punkt für die PLNs (d50).

Methodenbasierte Studien zeigten, dass die Interpretierbarkeit der Zytokin-Genexpressionsdaten beim Vergleich von Genexpression und Proteinlevel zum Teil differenziert betrachtet werden müssen. Jedoch ließ sich experimentell nachweisen, dass Genexpression und Proteinexpression auch in Zusammenhang gebracht werden können.

Bezugnehmend auf diese Aussage, beschrieb James *et al.* (2001), dass selbst eine geringe Genexpression von *IL-4* und die damit verbundene Konzentration an IL-4 schon einen signifikanten antiinflammatorische Wirkung hat. Ein weiterer Vergleich bestätigte, dass IFN- γ im gleichen Maße auf Gen- und Proteinebene exprimiert wird und keinen signifikanten posttranslationalen Einflüssen unterliegt [153, 154]. Das bedeutet für diese Arbeit, dass zwar eine differenzierte Betrachtung der gesammelten Daten zur Interpretation vorgenommen werden muss, jedoch lässt die Gesamtheit der Daten aus Genexpression, Haemogramme und dem Infiltrationsstatus eine schlüssige Bewertung und Prädiktion der Prozesse zu.

Zusammenfassend zeigten die Daten, dass die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine während der frühen Phase der Inselinfiltration (d40) signifikant höher exprimiert wurden. Aus den dazugehörigen immunhistologischen Analysen ging hervor, dass die Unterschiede von infiltrierten und nicht-infiltrierten Tieren mit der Genexpression der PBMCs und PLNs beim beginnenden T1DM korrelieren.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Genexpressionsprofile und einzelne Marker der Zytokine und Chemokine von PMBCs einen repräsentativen Status für die einzelnen Phasen der Inselinfiltration im T1DM einnehmen können.

4.4. Entscheidungsbäume-ein Werkzeug zur prädiktiven Beschreibung des Inselinfiltrationsprozesses

Desweiteren sollte während dieser Arbeit geklärt werden, ob sich innerhalb der generierten Genexpressionsdaten auf der Basis von Entscheidungsbaummodellen relevante Biomarker (aus PBMCs) des Infiltrationsprozess aufdecken lassen, die einen prädiktiven Wert im Hinblick auf die Diabetesentstehung haben.

Mit Hilfe eines Klassifizierungsalgorithmus (C4.5) der WEKA-Software, war es möglich die Genexpressionsdaten zur Erstellung von Entscheidungsbäumen und somit zur prädiktiven Beschreibung des Infiltrationsprozesses zu nutzen.

Zusammenfassend zeigen die Entscheidungsbäume, dass in Abhängigkeit vom Expressionsniveau und Zeitpunkt einzelne Gene (Marker) eine relevante Bedeutung für Infiltrationen haben. Diese Aussage konnte durch Erstellung einer Genrangfolge und zeitpunktspezifischer biologischer Netzwerke untermauert werden.

Die Untersuchungen ergaben, dass für die LEW.1AR1-*iddm* Ratten offensichtlich die Genexpression von *IL-1 β* eine herausragende Rolle bei der Diabetesentstehung zum Zeitpunkt Tag 40 spielt. Mit steigendem Alter war zudem eine Kombinationen mehrerer Marker, an Tag 45 (*IL-1 β* , *TNF- α*), 50 (*CTLA4*, *CD-25*), 55 (*NRP1*, *IL-1 β*) und 60 (*IL-10*) zu erkennen, denen der höchste prädiktive Wert für den Infiltrationsprozess durch die bioinformatische Analyse eingeräumt wurde.

Als Vertreter der proinflammatorischen Zytokine wurde *IL-1 β* bereits häufig als wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Prozesse bei T1DM beschrieben. *IL-1 β* wird von aktivierten Makrophagen produziert und wirkt auf T- und B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und Hepatozyten als Aktivator und Initiator von Effektorfunktionen. Aufgrund der durch *IL-1 β* ausgelösten Signalkaskade welche Apoptose der Zielzellen und Fieber auslöst, kommt es verstärkt zum Gewebeuntergang [99, 155, 156].

Basierend auf der Entscheidungsbaumanalyse konnte *IL-1 β* als stärkster prädiktiver Marker des Infiltrationsprozess an Tag 40 herausgearbeitet werden und korreliert so mit den signifikant hohen Expressionsniveaus von *TNF- α* und *IFN- γ* . Die Rangfolgenanalyse, basierend auf den Entscheidungsbäumen, ergab, dass *IL-10* und *FoxP3* nachfolgend auf *IL-1 β* eine verstärkte und *IL-4*, *L-Selektin* und *CD-25* eine schwächere prädiktive Rolle innerhalb des Infiltrationsprozess zu haben scheinen.

Da die Expression von *TNF- α* und *IFN- γ* auf direktem Weg und indirekt über *TGF- β* die Expression von *IL-1 β* verstärkt, ist deren Trias als essentiell für die Betazellzerstörung beschrieben worden [157]. Im Zusammenhang mit einer hohen Expression von Chemokinen

(Expression gefördert durch *IL-1 β*) welche die Immunzellrekrutierung verstärken, entsteht ein Gesamtbild einer autoimmunen Inflammation [21, 81, 90].

Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass zu Tag 40 ein Marker (*IL-1 β*) eine prädiktive Rolle für den Infiltrationsprozess spielte und im Zusammenhang mit den anderen analysierten Genen sich ein Netzwerk von relevanten Genen formen lässt. Dieses Netzwerk spiegelt, dann ein proinflammatorisches prädiktives Gesamtbild der frühen Infiltrationsphase wider.

Interessanterweise konnten mit *TNF- α* und *IL-1 β* zwei proinflammatorische Zytokine zum Zeitpunkt Tag 45 aufgedeckt werden die zusammen eine prädiktive Bedeutung für den Infiltrationsprozess besitzen. Die Ranglistenanalyse ergab nach *IL-1 β* und *TNF- α* eine verstärkte Beteiligung von *FoxP3*, *TGF- β* , *NRP-1* und *L-Selektin*. Diese Ergebnisse unterstützen die These der stärkeren Bedeutung von regulatorischen Prozesse (FoxP3 und TGF- β) während bzw. als Gegenreaktion des Körpers auf eine Inflammation (T-Zellmarker NRP-1 und L-Selektin).

Wie zuvor beschrieben, ist *IL-1 β* ein apoptoseinduzierendes Zytokin welches in Kombination mit *TNF- α* und *INF- γ* eine stark proinflammatorische Wirkung entfaltet. *TNF- α* bewirkt die chemotaktische Bewegung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsort und fördert zusätzlich die Apoptose von Zellen sowie die Freisetzung von Chemokinen [77, 158]. Eine Dysregulation von *TNF- α* ist auch mit Autoimmunerkrankungen wie T1DM assoziiert, so wie eine höhere Genexpression zum frühen Zeitpunkt führt zur Verstärkung des Krankheitsbildes [159, 160].

Bezüglich des Entscheidungsbaumes zu Tag 45 lässt sich schlussfolgern, dass innerhalb der frühen Infiltrationsphase in *LEW.1AR1-iddm* Tieren proinflammatorische Zytokine den Infiltrationsprozess dominieren.

Die Entscheidungsbaumanalyse ergab zum Zeitpunkt 50 Tage einen Wechsel von proinflammatorischen Zytokinen zu regulatorischen- und T-Zellmarkern. Eine Kombination von *CTLA4* und *CD-25*, in Abhängigkeit des Genexpressionsniveaus, erwies sich an Tag 50 als prädiktiv für den Infiltrationsprozess. In der Ranglistenanalyse zeigte sich mit *IFN- γ* , in Kombination mit *CD-25*, ein weiterer proinflammatorischer Marker der eine zentrale Rolle in Inflammationsprozessen einnimmt. Mit Fokus auf das Gennetzwerk ergibt sich auch zum Zeitpunkt 50 Tage die Schlussfolgerung, dass die Beteiligung mehrerer regulatorischer Gene den Inflammationsprozess definiert.

Mit *CTLA4* wurde ein Marker identifiziert, der ein inhibitorisches Signal in T-Zellen induziert und erst einige Tage nach T-Zellaktivierung vermehrt exprimiert wird. Die Signalübertragung bewirkt als antiinflammatorischer Vorgang eine Hemmung der Zellproliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen [155]. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der zeitgleich signifikant

erhöhten Expression von *INF- γ* , *IL-1 β* , *IL-10* in PBMCs und *IL-4* in PLNs eine Gegenregulation durch T-Zellen stattfindet, welche vermehrt als Folge der Inflammation in Inseln infiltrierter LEW.1AR1-*iddm* Ratten nachzuweisen waren.

Aus Studien ist bekannt, dass eine Behandlung mit anti-CTLA4-mAb in der NOD-Maus zur raschen Ausprägung des Diabetes im Vergleich zu nicht behandelten Tieren führte [161] da die Funktion von Effektor-T-Zellen herabreguliert wurde [101]. Im Vergleich zu verschiedenen humanen Studien zeigte sich, dass ein Polymorphismus im *CTLA4*-Gen signifikant mit erhöhtem Risiko für T1DM verbunden ist und daraus die relative Bedeutung von CTLA4 in regulatorischen Prozessen der T-Zellen resultiert [162].

Das im Entscheidungsbaum mit *CTLA4* in Kombination auftretende *CD25* ist ein Transmembranprotein welches als Teil des IL-2 Rezeptors (IL-2R) auf aktivierten T-Zellen, aktivierten B-Zellen, Thymozyten, Oligodendrozyten und myeloiden Vorläuferzellen vorkommt. In der Literatur wird CD25 als Teil eines Rezeptors beschrieben, der ein inhibitorisches Signal durch Bindung von Interleukin-2 (IL-2) vermittelt und somit die Expression des T-Zellinhibitors CTLA4 und des Regulators FoxP3 induziert.

Eine an diabetischen Ratten durchgeführte Lymphozytentransferstudie zeigte, dass ein Transfer von CD-4⁺ CD-25⁺ regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu CD-4⁺ CD-25⁻ T-Zellen die Diabetesinzidenz von etwa 65 % auf etwa 20 % herabsetzen konnte [163].

Demnach könnte eine auf dem Entscheidungsbaum von Tag 50 basierende Erklärung lauten, dass eine geringere Expression von *CD-25* bei gleichzeitig erhöhter Expression von *CTLA-4* prädiktive Bedeutung für eine Infiltration hat. Der Wechsel von proinflammatorischen Zytokinen zu regulatorischen- und T-Zellmarkern korrelierte mit der Analyse der PCR-Arrays, da deren Genexpressionsniveau in infiltrierten Tieren deutlich geringer als in nicht infiltrierten Tieren ausfiel.

Im Gegensatz dazu zeigten nur die Chemokine *Cxcl2* und *Cxcl3*, welche für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten von Bedeutung sind, eine hohe Genexpression in der PCR-Array Analyse. Dieses Ergebnis wird durch die signifikant hohen Zellpopulationen der neutrophilen Granulozyten im Blutbild der infiltrierten Tiere zum Zeitpunkt 50 Tage untermauert. Im Zusammenhang ergab sich zwar auf Basis der Genexpression durch den Organismus eine Phase der Gegenregulation die aber letztendlich nicht aufgehalten werden konnte.

Im weiteren zeitlichen Verlauf ergaben sich in der Entscheidungsbaumanalyse an Tag 55 zwei Abhängigkeiten für die Prädiktion des Infiltrationsprozesses. Zum einen wurde mit niedrigerer Genexpression von *NRPI* bei gleichzeitig erhöhter Genexpression von *IL-1 β* der Vorgang der Infiltration beschrieben und zum anderen wies mit hoher Genexpression von *NRPI* eine

prädiktive Bedeutung für den Infiltrationsprozess auf. Innerhalb der Rangfolgenanalyse zeigte sich nach *NRP-1* und *IL-1 β* der Regulator *FoxP3*, das T-Zellterminationssignal *CTLA4* und der T-Zellmarker *L-Selectin* mit prädiktiver Bedeutung für den Infiltrationsprozess. Auch dieses Ergebnis hebt die These hervor, dass im weiteren zeitlichen Verlauf nicht vermehrt proinflammatorische Prozesse sondern verstärkt regulatorische Vorgänge ablaufen.

Wie zuvor beschrieben, bewirkt die Interaktion zwischen dendritischen Zellen (DZs) und T-Zellen über NRP1 eine Umlagerung des Zytoskeletts beider Zelltypen und beeinflusst den Aktivierungsstatus der T-Zellen positiv [110]. Da der Marker NRP1 zudem auf dendritischen Zellen vorkommt und an der Initiation der primären Immunantwort beteiligt ist, nimmt NRP1 eine entscheidende Rolle während der Immunantwort ein [113]. Diese Bedeutung von NRP1 verstärkt die Annahme, dass NRP1 eine Rolle bei T-Zellmigrationsvorgängen zum Ort der Inflammation spielt. Die an Tag 60 durchgeführten Entscheidungsbaumanalysen zeigten mit erhöhter Genexpression von *IL-10* erstmals einen antiinflammatorischen Marker welchem in der Rangfolge der Marker erneut der T-Zellmarker *NRP1* folgte.

Des Weiteren wurden erhöhte Genexpressionsniveaus für proinflammatorische Zytokine nachgewiesen. Das unterstreicht die Vermutung eines erneuten Wechsels von regulatorischen Genen in Richtung der pro- und antiinflammatorischer Zytokine zum späten Infiltrationszeitraum zwischen 55 und 60 Tagen. Dabei korrelieren die Genexpressionsanalysen der Einzelsonden mit den PCR-Arrays insofern das inflammatorische Zytokine und Chemokine wieder verstärkt zu Tag 60 exprimiert wurden. Die relative Bedeutung von *IL-10* als prädiktiver Marker für den Infiltrationsprozess offenbart sich auch in der biologischen Bedeutung, da IL-10 vorwiegend inhibitorische Eigenschaften besitzt und vor allem die Synthese andere Zytokine unterdrückt. In diesem Fall scheint eine Gegenregulation keine Rolle mehr zu spielen da betazellzerstörende Prozesse bereits vollzogen sind und die Tiere unmittelbar in den diabetischen Zustand übergehen. Die Synthese von IL-10 erfolgt hauptsächlich in aktivierten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Mastzellen [97]. Proinflammatorische Zytokine wie IFN- α und TNF- α fördern die Produktion von IL-10. Nachweislich wurden an Tag 60 erhöhte Genexpressionsniveaus dieser proinflammatorischen Zytokine in den pankreas drainierenden Lymphknoten festgestellt. Möglicherweise stellt sich mit IL-10 eine Regulation gegenüber der Inflammation ein, die zwar prädiktiven Charakter hat aber nicht mehr zu diesem Zeitpunkt auf natürlichem Weg aufgehoben werden kann. Das IL-10 auch eine starke Bedeutung beim Diabetes hat, ergab sich aus Experimenten an der NOD-Maus. Hierbei wurde nachgewiesen, dass eine reduzierte IL-10 Produktion (Blockade des T-Zellkostimulators) durch

die FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen mit einem schwereren Krankheitsverlauf des Diabetes einhergeht [164].

Das während dieser Arbeit postulierte wiederaufkommende inflammatorische Signal wiederholt sich auch auf Basis des Chemokinearrays. Dieser Array zeigte zum Zeitpunkt 60 Tage eine weitere starke Expression der Chemokine. Ein Vergleich zu den Blutbildern, die zum gleichen Zeitpunkt keine signifikant erhöhten Zellpopulationen mehr aufwiesen, lässt vermuten, dass Immunzellen schon verstärkt aus dem Blut über die PLNs ins Pankreas immigriert waren.

Zusammenfassend ergab sich in den Infiltrationsprozessen ein inflammatorisches Muster welche Genexpressionsunterschiede in Abhängigkeit der verschiedenen Zeitpunkte (Tag 40, 45, 50, 55, 60) aufwiesen. Bei der Erstellung der Entscheidungsbäume spiegelten sich die unterschiedlichen Genexpressionsmuster in mehreren Biomarkern wider, die den Infiltrationsprozess prädiktiv beschrieben. Daraus ergab sich auf Basis der Entscheidungsbaumanalyse eine nicht-invasive Methode für die Vorhersage und Modellierung des Infiltrationsprozesses im Pankreas bevor es zu einer messbaren Hyperglykämie kommt.

Zusammenfassend gesagt, könnte man mit Hilfe einer Blutabnahme und dieser vielversprechenden Modellierungsmethode eine prädiktive Abschätzung des Diabetesrisikos vornehmen.

4.5. RIB5/2 Antikörper Intervention bewirkt Suppression der T1DM auslösenden Inflammation

Eine Behandlung von autoimmunologischen Erkrankungen oder die präventive Behandlung von Abstoßungsreaktionen von Transplantaten erfolgt medikamentös (z.B. Glukokortikoide) und wirkt sich auf das Immunsystem mit verschiedenen Nebenwirkungen aus. Aufgrund des Nachteils der ständig erforderlichen Medikamenteneinnahme, liegt die Herausforderung der Forschung darin, Toleranzzustände gegenüber Autoantigenen zu induzieren. Das Ziel neuer Therapiestrategien ist es, über eine Modulation der Immunantwort, selektiv die antigenspezifischen Zellen (T-Helferzellen) zu beeinflussen. Somit soll eine veränderte Ordnung der Oberflächenmoleküle von T-Zellen, sowie eine Veränderung der sezernierten Zytokinmuster bewirkt werden. Studien die zur Modulation von Oberflächenmolekülen auf Immunzellen durchgeführt wurden, befassten sich unter anderem mit dem α/β T-Zellrezeptor (T-ZR) [165], CD-8 [166], CD3 [121, 167] und CD25 [168].

Bei dem in der vorliegenden Doktorarbeit genutzten Antikörper RIB5/2 handelte es sich um einen modulatorischen monoklonalen anti-CD-4 Antikörper. Der Wirkmechanismus des RIB5/2 Antikörpers basiert auf der Bindung zum CD-4 Rezeptorkomplex. Das auf reifen peripheren T_H-

Zellen, unreifen Thymozyten, Monozyten, Gewebsmakrophagen und einigen rattenspezifischen dendritischen Zellen vorkommende CD-4-Molekül ist für die Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor von großer Bedeutung [169]. Der in unseren Experimenten applizierte RIB5/2 Antikörper führt zu einer Bindung an den CD-4-Rezeptorkomplex welcher dann internalisiert oder von der Zelle abgetrennt („Shedding“) wird. Das Fehlen des CD-4-Rezeptors, bewirkt einen Anstieg der für eine T-Zellaktivierung erforderlichen Antigenkonzentration. Die Behandlung induzierte eine Toleranz gegenüber der Betazellen, so dass eine Entwicklung des T1DM unterbunden wurde.

Die RIB5/2 Antikörper behandelten Tiere zeigten im Verlauf der Behandlung und in der Zeit bis zum Alter von 120 Tagen keine auffälligen Krankheitssymptome oder sonstige Nebenwirkungen. Der Vergleich von nicht-depletierenden AKs (RIB5/2) mit depletierenden AKs (lang anhaltender Verlust (bis zu zwei Jahre) von CD-4⁺ T-Zellen (80 %)) [170] bewies, dass es nach anti-CD-4 RIB5/2 Antikörperbehandlung nicht zu einer signifikanten Reduktion der T-Zellzahl kam. Der nicht-depletierende Antikörper RIB5/2 verursachte nach der Bindung eine Internalisation oder ein Abtrennen (Shedding) der CD-4 Moleküle, die erst nach längerer Zeit wieder an der Oberfläche reexprimiert werden [171]. Der Vorteil des monoklonalen anti-CD-4 Antikörper liegt darin, dass die Applikation des Antikörpers zur Induktion der Toleranz nur über einen definierten Zeitraum stattfand.

Die Grundlage für diesen definierten Zeitraum der Behandlung bildete die Tatsache, dass die Inselinfiltration der LEW.1AR1-*iddm* Ratten fokussiert im Zeitraum zwischen 40 und 60 Tagen nach Geburt auftreten. Eine weitere Applikation des Antikörpers nach Toleranz war nicht mehr notwendig und die selektive Wirkung auf T-Helferzellen verursachte keine signifikanten Nebenwirkungen.

Hinsichtlich der Abschätzung von möglichen Nebenwirkungen nach einer Antikörperbehandlung bei LEW.1AR1-*iddm* Ratten, wurden die behandelten Tiere bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 120 Tagen observiert. Dabei stellten sich keine Anzeichen zur Entwicklung des für das LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell typischen T1DM oder eine Hyperglykämie ein. Sporadisch wurden unmittelbar nach Antikörperbehandlung für einen kurzen Zeitraum leichte Fiebersymptome festgestellt.

4.6. RIB5/2 Antikörperbehandlung spiegelt sich im Genexpressionsmuster des peripheren Blutes wider

Anhand der modulatorischen anti-CD-4 RIB5/2 Antikörper Intervention im LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell sollten Änderungen auf Ebene der Genexpression (PBMCs) erfasst und mit den Ergebnissen der Prädiktionsanalyse in Relation gebracht werden.

Die RIB5/2 Antikörperbehandlung ergab im Alter von 60 Tagen (20 Tage nach Applikation) eine deutliche Reduktion der Genexpression der proinflammatorischen Zytokine *TNF- α* und *IFN- γ* im Vergleich zu unbehandelten infiltrierten Tieren. Da *TNF- α* als Zytokin hauptsächlich durch aktivierte Makrophagen und $CD-4^+$ T-Lymphozyten während der akuten Entzündungsphase ausgeschüttet wird, kann durch die deutlich geringere Expression von *TNF- α* keine akute Inflammation mehr vorliegen [172].

IFN- γ tritt als Aktivator von Makrophagen auf und ist in der Literatur beschrieben, dass dessen starke Expression mit Entzündungen (angeborene und adaptive Immunität) und Autoimmunkrankheiten assoziiert ist. Sezerniert wird *IFN- γ* prädominant von natürlichen Killerzellen (NK), natürlichen T-Killerzellen (NKT), $CD-4^+$ und $CD-8^+$ T-Zellen. In Abhängigkeit vom Aktivitätsstatus der $CD-4^+$ T-Zellen wird *IFN- γ* mit *TNF- α* bei einer Inflammation gleichzeitig exprimiert [173]. Eine Gegenüberstellung der von uns untersuchten proinflammatorischen Zytokine ergab, dass *IL-1 β* kein signifikant vermindertes Expressionsniveau nach RIB5/2 Antikörperbehandlung in infiltrierten Tieren an Tag 60 bewirkt. Nichtsdestotrotz ist bekannt, dass erst eine zusätzliche Expression von *TNF- α* oder *IFN- γ* zur Induktion des *iNOS*-Gens führt. Die Induktion von *iNOS* führt zur verstärkten Produktion von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen die die Betazelle schädigen [21, 157]. Dies Vorgänge konnte auch an diabetischen, humanen-, NOD-Maus-, BB-Ratten- und LEW.1AR-*iddm* Ratten Inseln beschrieben wurden [88].

Es wurde auch eine deutlich verstärkte Genexpression von *IL-4* und *IL-10* (sezerniert durch T-Helferzellen und aktivierte T-Lymphozyten [93, 97]) an den diabetischen Inseln festgestellt [88]. Diese Beobachtung deckt sich mit der verstärkten Genexpression der Zytokine des peripheren Blutes, die in dieser Arbeit beschrieben wurde.

Die RIB5/2 Antikörperbehandlung ergab an Tag 60, dass die Inhibition der $CD-4^+$ T-Zellen zu einer niedrigen Genexpression der antiinflammatorischen Zytokine *IL-4*, *IL-10* und einer starken Genexpression von *TGF- β* im Vergleich zu infiltrierten Tieren führte. Dadurch bestätigt sich die Annahme, dass regulatorische Vorgänge verstärkt und die inflammatorischen Vorgänge und deren Gegenregulation herabreguliert wurden.

TGF- β hemmt dabei die Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten (T-Helferzellen, zytotoxische Zellen) und Makrophagen, schränkt somit die Inflammationsantwort ein und vermindert speziell die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF, IFN- γ und IL-1 [78, 99]. Die Funktionen der einzelnen Marker (IL-4, IL-10, TGF- β) schließen sich zu einem antiinflammatorischen Netzwerk zusammen, welches dann ein Gleichgewicht mit den proinflammatorischen Zytokinen während der Immunantwort bildet [174].

Zusammenfassend ergibt sich, dass die inflammatorischen Prozesse und deren Gegenregulation durch die RIB5/2 Antikörperbehandlung deutlich herabreguliert werden und eine Zerstörung der Betazellen die zu einem T1DM führen ausgeblieben ist bzw. unterdrückt wurden.

4.7. Verstärkte Genexpression der regulatorischen Gene *CTLA4*, *FoxP3* und *L-Selektin* als Folge der RIB5/2 Antikörperbehandlung

Die Genexpression der regulatorischen Faktoren *FoxP3*, *L-Selektin* und *CTLA4* zeigte im zeitlichen Verlauf von 40 bis 50 Tagen erst einen leichten und zum Zeitpunkt 60 Tage einen signifikanten Anstieg in behandelten Tieren auf. Das natürlich an der Oberfläche von CD-4⁺ T-Zellen lokalisierte CTLA4 Protein vermittelt ein inhibitorisches Signal an die T-Zellen. Durch diese Signalvermittlung wird die Sekretion von Zytokinen durch T-Zellen unterbunden und eine weitere Inflammation unterdrückt [155]. Mit Hilfe verschiedener Studien wurde bewiesen, dass das Fehlen von CTLA4 zur Erhöhung des Diabetesrisiko in Tiermodellen und auch beim Menschen geführt hat [101, 161]. Die Verstärkung der *CTLA4* Genexpression weist im Falle der behandelten LEW.1AR1-*iddm* Ratten auf eine Unterdrückung der T-Zellantwort hin.

FoxP3 nimmt als Transkriptionsregulator eine zentrale Rolle in der Inhibierung der T-Zellaktivierung ein, dass in verschiedenen Studien auch im Zusammenhang mit der Diabetesentwicklung bestätigt wurde. Eine Studie bewies, dass ein Transfer von T-Zellen (CD-4⁺ CD-25⁺, starke FoxP3-mRNA Expression) in BB-Ratten eine Diabetesentwicklung verlangsamte [105]. Eine weitere FoxP3-Studie bewies, dass eine hohe Genexpression von *FoxP3* nachweislich zu einer suboptimalen T-Zellaktivierung führte [103]. Die verstärkte *FoxP3* Genexpression in den behandelten LEW.1AR1-*iddm* Ratten stellt einen weiteren Beweis für die Annahme, dass eine Verstärkung der regulatorischen Prozesse stattfand, dar.

Das nach Antikörperbehandlung in LEW.1AR1-*iddm* Ratten verstärkt exprimierte *L-Selektin* ist als Adhäsionsmolekül beschrieben welches den Kontakt zwischen Zellen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) und Gefäßwänden vermittelt. Hierbei spielt L-Selektin eine wichtige Rolle bei der Emigration von Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten [102]. Dabei scheint L-Selektin während der Diabetesentwicklung mehrere Rollen einzunehmen. Einerseits wurden

bei diabetischen- und prädiabetischen Patienten erhöhte Spiegel von L-Selektin im Serum nachgewiesen [106] und andererseits konnte für L-Selektin bestätigt werden, dass es nach Aktivierung der T-Zellen und Abtrennen der L-Selektin Moleküle zu einer starken mRNA-Expression des L-Selektin-Gens kommt. Weiterhin ging aus einer T-Lymphozytentransferstudie (CD-4⁺ CD-8⁻) an diabetischen Ratten hervor, dass nur T-Zellen, die zusätzlich L-Selektin exprimierten eine protektive Wirkung vor Diabetes hervorriefen [175].

Der auslösende Mechanismus und die beteiligten Komponenten zur Re-Expression von L-Selektin sind jedoch derzeit noch nicht identifiziert [107]. Andere Arbeitsgruppen haben für *L-Selektin* eine hohe Expression in PBMCs und nach Eintritt in Lymphknoten eine um 70 % erniedrigte Expression beschrieben. Allgemein wird eine niedrige Expression von L-Selektin mit einer Aktivierung der T-Zellen in Verbindung gebracht, welche sich aber zyklisch durch das Ein- und Auswandern ändert [141].

Aufgrund der erhöhten *L-Selektin* Genexpression in antikörperbehandelten LEW.1AR1-*iddm* Ratten und der zahlreichen Beschreibungen bei der Diabetesentwicklung, besteht die Hypothese, dass L-Selektin ein Zirkulieren der Immunzellen vermindert und eine Abschwächung der Immunreaktion unterstützt. Daraus ergibt sich, dass die regulatorischen Faktoren CTLA, FoxP3 und L-Selektin einen starken Einfluss auf die Diabetesentwicklung haben und durch eine Behandlung mit dem Antikörper RIB5/2 deutlich stärker exprimiert werden.

Der untersuchte T-Zellmarker *Neuropilin-1* (NRP1) konnte an Tag 60 mit signifikant niedrigerer Genexpression in antikörperbehandelten Tieren nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigte der T-Zellmarker (CD-25) an Tag 50 zunächst eine signifikant verminderte Genexpression in behandelten Tieren, wobei dieser an Tag 60 auf einem ähnlichen Niveau wie in den infiltrierten Tieren exprimiert wurde.

Für *Neuropilin-1* konnte nachgewiesen werden, dass dieses die Interaktion zwischen dendritischen Zellen (DZs) und T-Zellen hinsichtlich des Aktivierungsstatus der T-Zellen positiv beeinflusst [110]. Daraufhin lässt sich ableiten, dass aufgrund der geringen Expression von NRP1 keine signifikante T-Zellaktivierung zu diesem Zeitpunkt in den antikörperbehandelten Tieren vorliegt.

Eine ähnliche Funktion kommt dem Oberflächenmarker CD-25 der regulatorischen T-Zellen zu. In einer Lymphozytentransferstudie in diabetischen Ratten wurde gezeigt, dass CD-4⁺ CD-25⁺ regulatorische T-Zellen im Vergleich zu CD-4⁺ CD-25⁻ T-Zellen die Diabetesinzidenz von etwa 65 % auf etwa 20 % herabsetzen konnten [163].

Mit einer ansteigenden Genexpression von CD-25 zum Zeitpunkt 60 Tage, könnte zusätzlich aufgrund der Korrelation mit verstärkt ablaufenden regulatorischen Prozessen (Inhibition der

T-Zellaktivierung, T-Zellverbleib im Lymphknoten) das Ausbleiben der Inflammation begründet werden.

Zusammengefasst bewirkte eine RIB5/2- Antikörperbehandlung eine deutlich niedrigere Expression von proinflammatorischen Genen und eine verstärkte Expression regulatorischer Gene. Schon frühzeitig konnte bewiesen werden, dass eine Modulation über anti-CD4 Antikörper eine Veränderung der Zytokinmuster durch Verschiebung der T-Helferzellantwort von Th1- zu Th2-Zellen bewirken und folglich die antiinflammatorischen Prozesse verstärkt werden [176].

Die Gesamtbetrachtung der Ergebnisse lässt ein umfassendes Bild entstehen, das unsere These der Netzbildung aus verschiedenen Faktoren die zum T1DM führen, unterstützt. Bei den verschiedenen Faktoren handelt es sich um Gene die entscheidenden Einfluss auf die Vorgänge der Infiltration (Immunzellen) [140] und Inflammation (Zytokine) [177] haben.

4.8. Zusammenfassende Betrachtung des anti-CD4 RIB5/2 Antikörpers im Vergleich zu anderen immunmodulatorischen Ansätzen

Unter dem Vorgang der Immunmodulation wird die pharmakologische Beeinflussung des Immunsystems zusammengefasst. Die Methode der Immunmodulation fand ihre ursprüngliche Anwendung bei Transplantationen zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen (Immunsuppression). Im Falle von Autoimmunerkrankungen werden unnatürlich verstärkte Reaktionen durch Immunsuppressiva gedämpft.

Eine von Jörns *et al.* (2010) an LEW.1AR1-*iddm* Ratten durchgeführte Präventionsstudie nutzte den immunmodulatorischen Wirkstoff Fingolimod (FTY20) um eine Manifestation des T1DM zu verhindern und nach Krankheitsbeginn einen Schutz der restlichen Betazellen zu bewirken [64]. FTY20 wird derzeit als Immunsuppressivum bei der Behandlung von humaner Multipler Sklerose eingesetzt, ist jedoch mit Nebenwirkungen wie Bradykardie, arterielle Hypertonie, Enzephalitis und Sehstörungen verbunden. Durch die FTY20 Behandlung ließen sich Immunzellinfiltrate und die Betazellapoptose des Pankreas und somit die Ausprägung des Spontandiabetes im LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell verhindern [64]. FTY20 bindet an T- und B-Lymphozyten und bewirkt eine Rezeptorinternalisation, was zur Hemmung der rezeptorabhängigen Auswanderung der Lymphozyten aus den Lymphknoten ins Blut führt. Daraufhin kommt es zu einer starken Absenkung der Lymphozytenzahl im peripheren Blut welches die Infektionsgefahr deutlich erhöht.

Eine Folgestudie von Jörns *et al.* zeigte, dass nur eine Kombinationstherapie (FTY20 und anti-TCR/CD-3 Antikörper) das Ausbleiben von erneuten Inselinfiltrationen und einer

Wiederherstellung der Betazellmasse mit normalem Blutzucker, wenn die Therapie unmittelbar nach Diabetesmanifestation begonnen wurde, bewirkte [178].

Die derzeit an Menschen getesteten anti-CD-3 Antikörper Teplizumab, Visilizumab, Otelixizumab und Muromonab sind bei den ursprünglichen Einsatzgebieten (Chronische Entzündungen von Dick-, Dünn-, Mastdarm, T1DM) als nicht ausreichend erfolgreich getestet worden oder waren mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen behaftet.

Im Vergleich zu anderen Studien, stellte sich die immunmodulatorische RIB5/2 Antikörperbehandlung im Hinblick der aufgetretenen Nebenwirkungen im Organismus als deutlich erfolgversprechend dar.

Die immunsuppressive Wirkung der anti-CD-4 Antikörperbehandlung wird maßgeblich durch die Modulation der CD-4 Moleküle gesteuert. Der RIB5/2 Antikörper verursachte eine deutliche Reduzierung funktionsfähiger CD-4 Moleküle auf der Oberfläche der T-Helferzellen. Folglich sinkt die Fähigkeit zur Aktivierung der T-Helferzellen durch die APZs. Eine schnelle Reexpression von CD-4 Molekülen an der Zelloberfläche spricht für eine häufiger nötige Applikation des Antikörpers.

Daraus ergibt sich eine einfachere Möglichkeit zur Behandlung und Dosierung während einer Therapie. Wobei die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Tiermodellen auf den humanen Organismus stets kritisch betrachtet werden muss, da es sich bei dem RIB5/2 Antikörper um einen rattenspezifischen Antikörper handelt.

Auf Basis der Ergebnisse des rattenspezifischen RIB5/2 Antikörpers ergibt sich aber die Möglichkeit über eine Generierung von humanen anti-CD-4 Antikörpern einen neuen Forschungsansatz mit vergleichbarem Wirkungsspektrum zu etablieren.

5. Perspektiven

Mit Hilfe des LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodells für den autoimmunen Typ 1 Diabetes mellitus, war es möglich, in der prädiabetischen Phase das Genexpressionsprofil proinflammatorischer Zytokine und Marker der Immunzellaktivierung mit der Infiltration der Pankreasinseln zu korrelieren. Die Daten bestätigen, dass eine systemische Inflammation ein wesentlicher Trigger für die Infiltration darstellt und die Aktivierung autoaggressiver T-Zellen in der Pankreasinsel einleitet. Für die klinische Diagnostik und Therapie des Typ 1 Diabetes ergeben sich daher sehr interessante Perspektiven:

1. Individuen mit erhöhtem Typ 1 Diabetes-Risiko, wie z.B. Geschwister von neu diagnostizierten Patienten oder mit erhöhten Autoantikörpertitern, können durch Genexpressionsprofile der Blutzellen auf einen systemischen Inflammationsstatus hin überprüft werden. Hiermit wäre eine Risikostratifizierung und eine therapeutische Intervention mit immunmodulatorischen Pharmaka möglich.
2. Therapeutische Interventionsmöglichkeiten in der frühen systemischen Triggerphase bestehen in der temporären funktionellen Inaktivierung von CD-4⁺ T-Zellen, wie am Beispiel des RIB5/2 Antikörpers in der vorliegenden Promotionsarbeit gezeigt werden konnte. Weitere interventionelle Strategien, die von anderen Autoimmunerkrankungen abgeleitet sind, bestehen in der Neutralisierung von Zytokinen/Chemokinen durch Antikörper oder temporärer Blockade der Rezeptoren.
3. Bei Diagnostik einer progredienten Inselinfiltration, wie an den Genexpressionsmustern zwischen Tag 50 und 55 beim LEW1.1AR1-*iddm*-Rattenmodell gezeigt wurde, wäre eine Immunintervention nur mit Nebenwirkungen verbunden und würde zudem den Prozess der Betazellzerstörung nicht aufhalten können. Die Patienten (zumeist Kinder und Jugendliche) können hierdurch vor belastenden Behandlungsstrategien bewahrt werden.
4. Die Decision-Tree Analysen zeigen, dass mit einer überschaubaren Zahl biologisch-informativer Marker eine Aussage über den Infiltrationsstatus der Pankreasinsel möglich ist. Dies eröffnet die Perspektive, Individuen mit einem potentiell erhöhten Diabetesrisiko über den Infiltrationsstatus zu informieren ohne dass invasive Maßnahmen (Pankreasbiopsie) erforderlich sind.

Diese Expressionsalgorithmen inflammatorischer und regulatorischer Gene besitzen daher ein hohes Potential zur Identifikation von Patienten für Immuninterventionen und bilden somit die Basis einer Immuntherapie, die dem Stadium der Betazellzerstörung durch Immunzellen gerecht wird.

6. Zusammenfassung

Hintergrund:

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der insulinproduzierende Betazellen des Pankreas durch autoaggressive Zellen des lymphozytären Systems zerstört werden. Die Erkrankung manifestiert sich bis zum frühen Erwachsenenalter und erfordert durch die progrediente Zerstörung der Beta-Zellmasse eine lebenslange Substitution des Hormons Insulin um den Blutglukosespiegel im Normbereich zu halten. Als Triggermechanismen für die Aktivierung von autoaggressiven T-Zellen gelten neben Nahrungsantigenen wie z.B. Kuhmilchproteinen nach heutigem Kenntnisstand auch Virusinfektionen des Gastrointestinaltraktes (Enteroviren) sowie des Respirationstrakts. Die hierdurch ausgelöste Entzündungsreaktion wirkt als ein Initiator der T-Zellaktivierung. Eine genaue Kenntnis der Zusammenhänge zwischen den inflammatorischen Trigger und der Beta-Zellzerstörung eröffnet die Perspektive immunmodulatorischer Strategien, insbesondere für Risikopatienten, die Autoantikörper gegen Betazellproteine entwickelt haben.

Fragestellung:

In der Promotionsarbeit sollte geklärt werden, ob proinflammatorische und antiinflammatorische Gene in mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit der Infiltration der Pankreasinsel und der Betazellzerstörung in der prädiabetischen Phase korrelieren. Mit Progression der Betazellzerstörung sollten die Blutzell-Genexpressionsdaten mit den Genexpressionen in drainierenden pankreatischen Lymphknoten und der Milz verglichen werden. Mittels bioinformatischer Entscheidungsbaumanalysen (Decision-Trees) sollten Muster von Biomarkern identifiziert werden, die für frühe und späte Phasen der Betazellautoimmunität charakteristisch sind. Diese Daten wurden mit einer Kohorte verglichen, die mit einem immunmodulatorischen RIB5/2 anti-CD-4 Antikörper behandelt wurden, der die Aktivierung von T-Helferzellen verhindert und die Entwicklung einer Immuntoleranz fördert.

Experimentelles Modell:

Die Untersuchungen wurden an dem LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell des Autoimmundiabetes durchgeführt. Die LEW.1AR1-*iddm* Ratte entwickelt mit einer Inzidenz von 60 % nach dem 60. Lebensstag einen T-Zell vermittelten Autoimmundiabetes, der von der Pankreashistologie und der Stoffwechselsymptomatik (Hyperglykämie, Ketoazidose) mit menschlichen Typ 1 Diabetes mellitus vergleichbar ist. Vorstudien konnten belegen, dass zwischen dem 40. und 60. Lebensstag

die Pankreasinseln durch Makrophagen und T-Zellen infiltriert werden. Der progrediente Betazellverlust führt bei infiltrierten Inseln zur Diabetesmanifestation, so dass der Infiltrationsstatus als Diabetesprädictor während der prädiabetischen Phase gelten kann.

Es wurden mononukleäre Immunzellen des peripheren Blutes (PBMC) der LEW.1AR1-*iddm* Ratte hinsichtlich des Genexpressionsprofils mittels quantitativer Realtime PCR untersucht. Dabei fokussierte sich die Analyse auf die Genexpression von Zytokinen, Chemokinen und Genen der T-Zell Aktivierung zu den verschiedenen Stadien der Autoimmunität in der prädiabetischen Phase: beginnende Inselinfiltration (Tag 40-50), progrediente Inselinfiltration (Tag 50-60) und bevorstehende Diabetesmanifestation (Tag 60).

Ergebnisse:

Zum Zeitpunkt der Organentnahme waren alle Ratten normoglykämisch mit Blutglucosewerten zwischen 5 und 7,5 mmol/l. 31 % der Tiere zeigten leichtgradige Inselinfiltrationen am Tag 40 und massiven Inselinfiltrationen von 52 % an Tag 60 und.

Der Beginn der Inselinfiltration korrelierte mit einem signifikanten Anstieg der Genexpression der proinflammatorischen Zytokine (*TNF- α* , *IFN- γ* und *IL-1 β*) und Chemokinen (*Ccl2*, *7*, *21*, *24*, *Cxcl1-3* und *Cxcl11*) in PBMCs. Mit fortschreitendem Alter zeigte die Expression dieser Gene in PBMCs einen zweigipfligen Verlauf mit einem Maximum in der frühen Infiltrationsphase (d40) und zum Zeitpunkt der massiven Betazellzerstörung (d60). Interessanterweise stieg in PBMCs die Expression regulatorischer Zytokine und von T-Zellmarkern (*CD25* und *NRP1*) mit Progredienz der Betazellinfiltration und Abnahme der Betazellmasse an. In den drainierenden pankreatischen Lymphknoten sowie der Milz war jedoch während dieser Phase (d50 – d60) ein klarer proinflammatorischer Status nachweisbar. Die Ergebnisse wurden unter Anwendung bioinformatischer Algorithmen zur Generierung von Entscheidungsbäumen (Decision-Tree) genutzt. Daraus ergab sich, dass die Genexpressionsprofile von Zytokinen/Chemokinen in aufgereinigten PBMCs als Marker für unterschiedliche Stadien der Betazell-Autoimmunität dienen können um eine Prädiktion und Modellierung des Infiltrationsprozesses bei erhöhtem Typ 1 Diabetes Risiko und Erstmanifestation mit erhaltener Beta-Zell Restmasse zu ermöglichen. Dabei sind die Zytokine im Ranking *IL-1 β* , *IL-10*, *IL-4* und *FoxP3* charakteristisch für die Triggerphase der Inselinfiltration, die als ein systemischer Inflammationszustand zu verstehen ist. Mit progredienter Betazellzerstörung gewinnen die T-Zellmarker im peripheren Blut prädiktiven Charakter für die Inselinfiltration und Diabetesmanifestation. Ein proinflammatorischer Status bei massiver Abnahme der Beta-Zellmasse war charakteristisch für die Phase unmittelbar vor der Diabetesmanifestation und reflektierte quantitativ die lokale

Autoimmunität im Pankreasorgan. Die Gabe des anti-CD-4 Antikörper RIB5/2 während der Initialphase der Inselinfiltration bewirkte in PBMCs eine Expressionsabnahme von proinflammatorischen Zytokinen und erhöhter Expression von regulatorischen T-Zellmarkergenen. Der RIB5/2 Antikörper konnte die Inselinfiltration verhindern, was zu einer 100 %igen Abnahme der Diabetesinzidenz führte. Die Daten zeigen, dass die Funktion von CD-4 T-Zellen eine zentrale Rolle für den systemischen proinflammatorischen Status in der Triggerphase der Inselinfiltration spielt. Zudem validiert die RIB5/2 Therapie den prädiktiven Wert des PBC-Genexpressionsmusters als Biomarker für die Inselinfiltration.

Interpretation und Perspektive:

Die vorliegenden Daten belegen, dass Genexpressionsprofile in Immunzellen des Blutes in der frühen Phase der Inselinfiltration sich durch einen proinflammatorischen Status auszeichnen. Mit bioinformatischen Decision-Trees lässt sich ein Profil erstellen, dass bei entsprechender Auswahl pathogenetisch relevanter Gene auch für die Klinik anwendbar ist. So könnten bei Erweiterung des Zytokin- und Chemokinspektrums Risikopatienten (z.B. normoglykämische Geschwister diabetischer Patienten mit nachgewiesenen Autoantikörpern, sowie in der Phase nach abgeklungenen Virusinfektionen) Aussagen über die Inselinfiltration getroffen werden. Der proinflammatorische Aktivierungsstatus von PBMCs in der Frühphase der Inselinfiltration stützt zudem die Hypothese, dass eine systemische Inflammation einen wichtiger Trigger der Autoimmunität und somit auch ein therapeutisches Target darstellt. Die RIB5/2 Daten belegen zudem, dass CD-4 T-Zellen eine entscheidende Rolle für diese systemische Inflammation spielen. Der RIB5/2 Antikörper ist ein attraktives Therapieprinzip der Immunmodulation, da die T-Zellen hierdurch nicht massiv depletiert werden (mit der Folge einer Immunsuppression) sondern eine temporäre Funktionsblockierung die Möglichkeit der Toleranzentwicklung fördert. Es lohnt sich daher die Entwicklung eines humanen Antikörper-Pendants, der nicht depletierend sondern modulierend wirkt.

Die Daten der Promotionsarbeit haben somit die Rolle von systemischen Inflammationsmarkern in der Frühphase der Inselinfiltration untermauert und eröffnen die Perspektive eines optimierten Algorithmus für die Entwicklung eines Biomarkerprofils bei humanen Inselinfiltrationen. Mit effektiven immunmodulatorischen Strategien kann somit eine Diabetesmanifestation bei Risikopatienten verhindert werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Hummel, M. and A.-G. Ziegler, Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ-1-Diabetes, in *Diabetologie in Klinik und Praxis*. 2011, Thieme: Stuttgart.
2. Achenbach, P., et al., Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia*, 2009. 52(9): p. 1881-8.
3. Hürter, P., T. Danne, and K. Lange, *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen: Grundlagen - Klinik - Therapie*. Vol. 6. 2005: Springer. 602.
4. Paronen, J. and G.S. Eisenbarth, Immunopathogenesis of Type 1 Diabetes in Western Society, in *International Textbook of Diabetes Mellitus*, R.A. DeFronzo, et al., Editors. 2004, John Wiley & Sons Ltd.: Chichester.
5. Nokoff, N. and M. Rewers, Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Ann N Y Acad Sci*, 2013. 1281: p. 1-15.
6. Renz, H., *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin*. 2003, Berlin: de Gruyter.
7. Autoimmun-Stiftung, D. *Autoimmunerkrankungen*. 2013; Available from: <http://www.autoimmun.org/erkrankungen>.
8. Havlicek, J. and S.C. Roberts, MHC-correlated mate choice in humans: a review. *Psychoneuroendocrinology*, 2009. 34(4): p. 497-512.
9. Hahn, et al., Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex, in *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, S.H.E. Kaufmann, Editor. 2009, Springer: Heidelberg. p. 890.
10. Klein, J. and A. Sato, The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 2000. 343(10): p. 702-9.
11. Dorman, J.S. and C.H. Bunker, HLA-DQ locus of the human leukocyte antigen complex and type 1 diabetes mellitus: a HuGE review. *Epidemiol Rev*, 2000. 22(2): p. 218-27.
12. Nieveling, R. and V.v. Baehr. *Genetik und immunologische Funktionen des HLA-Systems*. Available from: <http://www.inflammatio.de/fachbeitraege/hla-assozierte-erkrankungen/genetik-funktion-und-nomenklatur-des-hla-systems.html>.
13. Jun, H.S. and J.W. Yoon, A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2003. 19(1): p. 8-31.
14. Peng, H. and W. Hagopian, Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006. 7(3): p. 149-62.
15. Knip, M. and O. Simell, Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(7): p. a007690.
16. Pickup, J.C. and G. Williams, *Textbook of Diabetes*, 2002, Wiley-Blackwell. p. 1520.
17. Harrington, L.E., et al., Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 2005. 6(11): p. 1123-32.
18. DDG. *Diabetes Typ 1 kündigt sich durch Antikörper an*. 2013 [19.06.2013]; Available from: <http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/presse/ddg-presse-meldungen/meldungen-detailansicht/article/diabetes-typ-1-kuendigt-sich-durch-antikoerper-an-bluttest-ermoeglicht-vorbeugende-behandlung-1.html>.
19. Ziegler, A.G., et al., Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Jama*, 2013. 309(23): p. 2473-9.
20. Eizirik, D.L. and T. Mandrup-Poulsen, A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*, 2001. 44(12): p. 2115-33.
21. Gysemans, C., et al., Cytokine signalling in the beta-cell: a dual role for IFNgamma. *Biochem Soc Trans*, 2008. 36(Pt 3): p. 328-33.
22. Thomson, W.A. and M.T. Lotze, *The Cytokine Handbook*. 4 ed. Vol. 2. 2003, London: Elsevier Science. 1572.
23. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 683-765.
24. Groux, H. and F. Cottrez, The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun*, 2003. 20(4): p. 281-5.
25. Nerup, J., et al., On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*, 1994. 37 Suppl 2: p. S82-9.
26. Mandrup-Poulsen, T., beta-cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes*, 2001. 50 Suppl 1: p. S58-63.

27. Driver, J.P., D.V. Serreze, and Y.G. Chen, Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol*, 2010. 33(1): p. 67-87.
28. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 447-85.
29. Yamada, K., et al., Sequence analysis of candidate genes for common susceptibility to type 1 and type 2 diabetes in mice. *Endocr J*, 2001. 48(2): p. 241-7.
30. Markle, J.G., et al., Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 2013. 339(6123): p. 1084-8.
31. Thayer, T.C., S.B. Wilson, and C.E. Mathews, Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2010. 39(3): p. 541-61.
32. Bortell, R. and C. Yang, The BB rat as a model of human type 1 diabetes. *Methods Mol Biol*, 2012. 933: p. 31-44.
33. Stadinski, B.D., et al., Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol*, 2010. 11(3): p. 225-31.
34. Gottlieb, P.A., et al., Chromogranin A is a T cell antigen in human type 1 diabetes. *J Autoimmun*, 2013.
35. Nakhoda, A.F., et al., The spontaneously diabetic Wistar rat. *Metabolic and morphologic studies. Diabetes*, 1977. 26(2): p. 100-12.
36. Ramanathan, S. and P. Poussier, BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev*, 2001. 184: p. 161-71.
37. Eisenbarth, G.S. *Animal Models of Type 1 Diabetes: Genetics and Immunological Function*. 2011; 2:[Available from: <http://som.ucdenver.edu/bdc/Book-Type1Diabetes/HTML/CH3/CH3.html>.
38. Prins, J.B., et al., Genetic variation within and between lines of diabetes-prone and non-diabetes-prone BB rats; allele distribution of 8 protein markers. *Lab Anim*, 1991. 25(3): p. 207-11.
39. Ellerman, K.E. and A.A. Like, Susceptibility to diabetes is widely distributed in normal class IIu haplotype rats. *Diabetologia*, 2000. 43(7): p. 890-8.
40. Ellerman, K.E., et al., Kilham rat triggers T-cell-dependent autoimmune diabetes in multiple strains of rat. *Diabetes*, 1996. 45(5): p. 557-62.
41. Dalberg, U.N., et al., The BB Rat, in *Immunoendocrinology: Scientific and Clinical Aspects*, G.S. Eisenbarth, Editor. 2011, Humana Press. p. pp 183-197.
42. Awata, T., D.L. Guberski, and A.A. Like, Genetics of the BB rat: association of autoimmune disorders (diabetes, insulinitis, and thyroiditis) with lymphopenia and major histocompatibility complex class II. *Endocrinology*, 1995. 136(12): p. 5731-5.
43. Wallis, R.H., et al., Type 1 diabetes in the BB rat: a polygenic disease. *Diabetes*, 2009. 58(4): p. 1007-17.
44. Mordes, J.P., et al., Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Ilar J*, 2004. 45(3): p. 278-91.
45. Kawano, K., et al., New inbred strain of Long-Evans Tokushima lean rats with IDDM without lymphopenia. *Diabetes*, 1991. 40(11): p. 1375-81.
46. Komeda, K., et al., Establishment of two substrains, diabetes-prone and non-diabetic, from Long-Evans Tokushima Lean (LETL) rats. *Endocr J*, 1998. 45(6): p. 737-44.
47. Yokoi, N., et al., A non-MHC locus essential for autoimmune type I diabetes in the Komeda Diabetes-Prone rat. *J Clin Invest*, 1997. 100(8): p. 2015-21.
48. Yokoi, N., et al., Establishment and characterization of the Komeda diabetes-prone rat as a segregating inbred strain. *Exp Anim*, 2003. 52(4): p. 295-301.
49. Yokoi, N., Identification of a major gene responsible for type 1 diabetes in the Komeda diabetes-prone rat. *Exp Anim*, 2005. 54(2): p. 111-5.
50. Schmitz, M.L., Activation of T cells: releasing the brakes by proteolytic elimination of Cbl-b. *Sci Signal*, 2009. 2(76): p. pe38.
51. Lenzen, S., et al., The LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2001. 44(9): p. 1189-96.
52. Weiss, H., et al., Genetic analysis of the LEW.1AR1-*iddm* rat: an animal model for spontaneous diabetes mellitus. *Mamm Genome*, 2005. 16(6): p. 432-41.

53. Jörns, A., et al., Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes*, 2005. 54(7): p. 2041-52.
54. Jörns, A., et al., Pathology of the pancreas and other organs in the diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat, a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Virchows Arch*, 2004. 444(2): p. 183-9.
55. Hoglund, P., et al., Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med*, 1999. 189(2): p. 331-9.
56. Arndt, T., et al., Prevention of spontaneous immune-mediated diabetes development in the LEW.1AR1-iddm rat by selective CD8+ T cell transfer is associated with a cytokine shift in the pancreas-draining lymph nodes. *Diabetologia*, 2009. 52(7): p. 1381-90.
57. Turley, S.J., et al., Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(49): p. 17729-33.
58. Nagata, M., et al., Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 1994. 152(4): p. 2042-50.
59. Voorbij, H.A., et al., Dendritic cells and scavenger macrophages in pancreatic islets of prediabetic BB rats. *Diabetes*, 1989. 38(12): p. 1623-9.
60. Arndt, T., et al., A variable CD3(+)T-cell frequency in peripheral blood lymphocytes associated with T1DM development in the LEW.1AR1-iddm rat. *PLoS One*, 2013. 8(5): p. e64305.
61. Faustman, D., et al., Abnormal T-lymphocyte subsets in T1D. *Diabetes*, 1989. 38(11): p. 1462-8.
62. Lapolla, A., et al., Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine*, 2005. 31(4): p. 280-7.
63. Mordes, J.P., et al., Transfusions enriched for W3/25+ helper/inducer T lymphocytes prevent spontaneous diabetes in the BB/W rat. *Diabetologia*, 1987. 30(1): p. 22-6.
64. Jörns, A., et al., Diabetes prevention by immunomodulatory FTY720 treatment in the LEW.1AR1-iddm rat despite immune cell activation. *Endocrinology*, 2010. 151(8): p. 3555-65.
65. Ziegler, A.G., et al., Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*, 1999. 48(3): p. 460-8.
66. Bonifacio, E., et al., Maternal type 1 diabetes reduces the risk of islet autoantibodies: relationships with birthweight and maternal HbA(1c). *Diabetologia*, 2008. 51(7): p. 1245-52.
67. Wen, L., et al., Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 2008. 455(7216): p. 1109-13.
68. Oresic, M., et al., Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med*, 2008. 205(13): p. 2975-84.
69. Herr, M., et al., Evaluation of fine mapping strategies for a multifactorial disease locus: systematic linkage and association analysis of IDDM1 in the HLA region on chromosome 6p21. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(9): p. 1291-301.
70. Bonifacio, E., et al., IDDM1 and multiple family history of type 1 diabetes combine to identify neonates at high risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2004. 27(11): p. 2695-700.
71. Colli, M.L., et al., MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA. *Hum Mol Genet*, 2010. 19(1): p. 135-46.
72. Steck, A.K., et al., Effects of non-HLA gene polymorphisms on development of islet autoimmunity and type 1 diabetes in a population with high-risk HLA-DR,DQ genotypes. *Diabetes*, 2012. 61(3): p. 753-8.
73. Tarlinton, D., et al., Architectural defects in the spleens of Nkx2-3-deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. *J Immunol*, 2003. 170(8): p. 4002-10.
74. Brentnall, M., et al., Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*, 2013. 14: p. 32.
75. Tiedge, M., et al., Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 1997. 46(11): p. 1733-42.
76. Tiedge, M., et al., Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes*, 1998. 47(10): p. 1578-85.

77. Rassow, J., et al., *Biochemie. Zytokine*. Vol. 3. 2012, Stuttgart: Thieme. 847.
78. Horn, F., *Zytokine - die Botenstoffe der Abwehr*, in *Biochemie des Menschen*. 2012, Thieme: Stuttgart. p. 645.
79. Peters, M. *Kommunikation des Immunsystems*. 2013 11.07.2013 [cited 2013; Available from: www.ruhr-uni-bochum.de/homeexpneu.
80. Muss, C. *Zytokindiagnostik*. Available from: <http://www.i-gap.org/app/dokumente/Zytokine%20Biovis.pdf>.
81. Cnop, M., et al., Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 2005. 54 Suppl 2: p. S97-107.
82. Goldberg, R.B., Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(9): p. 3171-82.
83. Snell-Bergeon, J.K., et al., Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(6): p. 2868-76.
84. Green, E.A. and R.A. Flavell, The temporal importance of TNFalpha expression in the development of diabetes. *Immunity*, 2000. 12(5): p. 459-69.
85. Rabinovitch, A., et al., Cytokine gene expression in pancreatic islet-infiltrating leukocytes of BB rats: expression of Th1 cytokines correlates with beta-cell destructive insulinitis and IDDM. *Diabetes*, 1996. 45(6): p. 749-54.
86. Sarkar, S.A., et al., Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. *Diabetes*, 2012. 61(2): p. 436-46.
87. Jiang, Z. and B.A. Woda, Cytokine gene expression in the islets of the diabetic Biobreeding/Worcester rat. *J Immunol*, 1991. 146(9): p. 2990-4.
88. Jörns, A., et al., Islet infiltration, cytokine expression and beta cell death in the NOD mouse, BB rat, Komeda rat, LEW.1AR1-iddm rat and humans with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2013.
89. Kaizer, E.C., et al., Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(9): p. 3705-11.
90. Padmos, R.C., et al., Distinct monocyte gene-expression profiles in autoimmune diabetes. *Diabetes*, 2008. 57(10): p. 2768-73.
91. Planas, R., R. Pujol-Borrell, and M. Vives-Pi, Global gene expression changes in type 1 diabetes: insights into autoimmune response in the target organ and in the periphery. *Immunol Lett*, 2010. 133(2): p. 55-61.
92. Levy, H., et al., Transcriptional signatures as a disease-specific and predictive inflammatory biomarker for type 1 diabetes. *Genes Immun*, 2012. 13(8): p. 593-604.
93. Kelly-Welch, A., E. Hanson, and A. Keegan, Interleukin-4 Pathway. *Science Signaling*, 2005: p. 293.
94. Mueller, R., T. Krahl, and N. Sarvetnick, Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *The Journal of experimental medicine*, 1996. 184(3): p. 1093-1099.
95. Mi, Q.S., et al., Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. *Diabetes*, 2004. 53(5): p. 1303-10.
96. Sobel, D.O., et al., Cyclophosphamide inhibits the development of diabetes in the diabetes-prone BB rat. *Diabetologia*, 2000. 43(8): p. 986-94.
97. Ng, T., et al., Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in immunology*, 2013. 4(129): p. 1-13.
98. Kolb, H., et al., Insulin therapy of prediabetes suppresses TH1 associated gene expression in BB rat pancreas. *Autoimmunity*, 1997. 26(1): p. 1-6.
99. Martin, M. and K. Resch, *Immunologie*. Vol. 1. 2009, Stuttgart: UTB Basics Ulmer. 320.
100. Filippi, C.M., et al., Transforming growth factor-beta suppresses the activation of CD8+ T-cells when naive but promotes their survival and function once antigen experienced: a two-faced impact on autoimmunity. *Diabetes*, 2008. 57(10): p. 2684-92.
101. Ueda, H., et al., Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 2003. 423(6939): p. 506-11.
102. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 1 ed. Vol. 1. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 334.

103. Kim, J.M. and A. Rudensky, The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 2006. 212: p. 86-98.
104. Camperio, C., et al., Forkhead transcription factor FOXP3 upregulates CD25 expression through cooperation with RelA/NF-kappaB. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e48303.
105. Lundsgaard, D., et al., In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4(+)CD25(+) T-cells expressing Foxp3. *Diabetes*, 2005. 54(4): p. 1040-1047.
106. MacKinnon, J.R., R.M. Knott, and J.V. Forrester, Altered L-selectin expression in lymphocytes and increased adhesion to endothelium in patients with diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, 2004. 88(9): p. 1137-1141.
107. Raffler, N., J. Rivera-Nieves, and K. Ley, L-selectin in inflammation, infection and immunity. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies | Cardiovascular diseases*, 2005. 2(3).
108. Sakaguchi, S., Naturally arising Foxp3-expressing CD25(+) CD4(+) regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 2005. 6(4): p. 345-352.
109. Bruder, D., et al., Frontline: Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 2004. 34(3): p. 623-630.
110. Tordjman, R., et al., A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response (vol 3, pg 477, 2002). *Nature Immunology*, 2003. 4(4): p. 394-394.
111. Hasan, N.M., et al., Genetic association of the neuropilin-1 gene with type 1 diabetes in children: Neuropilin-1 expression in pancreatic islets. *Diabetes research and clinical practice*, 2010. 87(3): p. e29-e32.
112. Weiss, J.M., et al., Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells 10.1084/jem.20120914 *The Journal of Experimental Medicine* 2012 209 (10): p. 1723-1742
113. WSU, NRP1 (neuropilin-1), NRP, VEGF165R, BDCA4 (blood dendritic cell antigen 4), 2008, Washington State University: Taxonomic Key Program (TKP).
114. Yang, Z.R., Mining gene expression data based on template theory. *Bioinformatics*, 2004. 20(16): p. 2759-66.
115. Ruan, J., et al., An ensemble learning approach to reverse-engineering transcriptional regulatory networks from time-series gene expression data. *BMC Genomics*, 2009. 10 Suppl 1: p. S8.
116. Alpaydin, E., Introduction to Machine Learning (Adaptive Computation and Machine Learning series). 2 ed. Adaptive Computation and Machine Learning series. 2009, Cambridge, Massachusetts: The MIT Press. 584.
117. Quinlan, J.R., Induction of decision trees. *Machine Learning*, 1986. 1(1): p. 81-106.
118. Kotsiantis, S.B., Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques. *Informatica*, 2007. 31: p. 249-268.
119. Soinov, L.A., M.A. Krestyaninova, and A. Brazma, Towards reconstruction of gene networks from expression data by supervised learning. *Genome Biol*, 2003. 4(1): p. R6.
120. Skyler, J.S., Primary and secondary prevention of Type 1 diabetes. *DiabetMed*, 2013. 30(2): p. 161-9.
121. Chatenoud, L., Immune therapy for type 1 diabetes mellitus-what is unique about anti-CD3 antibodies? *Nat Rev Endocrinol*, 2010. 6(3): p. 149-57.
122. Schloot, N.C. and I.R. Cohen, DiaPep277(R) and immune intervention for treatment of type 1 diabetes. *Clin Immunol*, 2013. 149(3): p. 307-16.
123. Daifotis, A.G., et al., Anti-CD3 clinical trials in type 1 diabetes mellitus. *Clin Immunol*, 2013. 149(3): p. 268-78.
124. Herold, K.C., et al., Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes*, 2013. 62(11): p. 3766-74.
125. Vudattu, N.K. and K.C. Herold, Treatment of new onset type 1 diabetes with teplizumab : successes and pitfalls in development. *Expert Opin Biol Ther*, 2014. 14(3): p. 377-85.
126. Yi, Z., et al., Long-term remission of diabetes in NOD mice is induced by nondepleting anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. *Diabetes*, 2012. 61(11): p. 2871-80.
127. Hayward, A.R., et al., Prevention of diabetes but not insulinitis in NOD mice injected with antibody to CD4. *J Autoimmun*, 1993. 6(3): p. 301-10.
128. Mayer, C.T., et al., CD4 blockade directly inhibits mouse and human CD4(+) T cell functions independent of Foxp3(+) Tregs. *J Autoimmun*, 2013. 47: p. 73-82.

129. Ellingsgaard, H., et al., Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(35): p. 13163-8.
130. Flöter, A., Analyzing biological expression data based on decision tree induction, 2005, University Potsdam.
131. Yuan, Y. and M.J. Shaw, Induction of fuzzy decision trees. Elsevier, *Fuzzy sets and systems*, 1995. 69(2): p. 125-139.
132. Ziegler, A.G. and G.T. Nepom, Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*, 2010. 32(4): p. 468-78.
133. Pipeleers, D., et al., Restoring a functional beta-cell mass in diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 2008. 10 Suppl 4: p. 54-62.
134. Matveyenko, A.V. and P.C. Butler, Relationship between beta-cell mass and diabetes onset. *Diabetes Obes Metab*, 2008. 10 Suppl 4: p. 23-31.
135. Bouwens, L. and I. Rooman, Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*, 2005. 85(4): p. 1255-70.
136. Tarabra, E., S. Pelengaris, and M. Khan, A Simple Matter of Life and Death-The Trials of Postnatal Beta-Cell Mass Regulation. *International Journal of Endocrinology*, 2012. 2012: p. 20.
137. Bonner-Weir, S., et al., Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*, 2010. 59(10): p. 2340-8.
138. Shi, C. and E.G. Pamer, Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(11): p. 762-74.
139. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*, 2011. 32(10): p. 452-60.
140. Valle, A., et al., Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes*, 2013. 62(6): p. 2072-7.
141. Klinger, A., et al., Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. *Int Immunol*, 2009. 21(4): p. 443-55.
142. Amulic, B., et al., Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*, 2012. 30: p. 459-89.
143. Yoshida, R., et al., Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem*, 1998. 273(12): p. 7118-22.
144. Eller, K., et al., CCR7 deficiency exacerbates injury in acute nephritis due to aberrant localization of regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol*, 2010. 21(1): p. 42-52.
145. Leon, B. and C. Ardavin, Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood*, 2008. 111(6): p. 3126-30.
146. Green, S.J., et al., Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett*, 1994. 43(1-2): p. 87-94.
147. Beyan, H., et al., A role for innate immunity in type 1 diabetes? *Diabetes Metab Res Rev*, 2003. 19(2): p. 89-100.
148. Hussain, M.J., et al., Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia*, 1996. 39(1): p. 60-9.
149. te Velde, A., et al., Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood Journal of The American Society of Hematology*, 1990. 76: p. 1392-1397.
150. Zamorano, J., M. Rivas, and M. Perez-G, Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Inmunología*, 2003. 22(2): p. 215-224.
151. Geiser, T. Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory lung disease. 1999. 129, 540-546.
152. Rus, V., et al., Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol*, 1995. 155(5): p. 2396-406.
153. Giulietti, A., et al., An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001. 25(4): p. 386-401.
154. James, S.P., Detection of cytokine mRNA expression by PCR. *Curr Protoc Immunol*, 2001. Chapter 10: p. Unit 10 23.
155. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. Vol. 3. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 285.

156. Contassot, E., H. Beer, and L. French, Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly*, 2012: p. 1-10.
157. Corbett, J. and M. McDaniel, Intraislet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. *The Journal of experimental medicine.*, 1995(181(2)): p. 559-68.
158. Murphy, K.M., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie*. Vol. 7. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 1093.
159. Lee, L.F., et al., The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(44): p. 15995-6000.
160. Christen, U., et al., A dual role for TNF-alpha in type 1 diabetes: islet-specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *J Immunol*, 2001. 166(12): p. 7023-32.
161. McCoy, K.D. and G. Le Gros, The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and Cell Biology*, 1999. 77(1): p. 1-10.
162. Chen, Z.X., et al., Association between cytotoxic T lymphocyte antigen-4 polymorphism and type 1 diabetes: A meta-analysis. *Gene*, 2013. 516(2): p. 263-270.
163. Stephens, L.A. and D. Mason, CD25 Is a Marker for CD4+ Thymocytes That Prevent Autoimmune Diabetes in Rats, But Peripheral T Cells with This Function Are Found in Both CD25+ and CD25⁺ Subpopulations. *The Journal of Immunology* 2000 165 (6): p. 3105-3110
164. Kornete, M., E. Sgouroudis, and C. Piccirillo, ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *Journal of immunology*, 2012. 188(3): p. 1064-1074.
165. Tsuchida, M., et al., Effects of irradiation, glucocorticoid and FK506 on cell-surface antigen expression by rat thymocytes: a three-colour flow cytofluorometric analysis. *Immunology*, 1994. 83(3): p. 469-75.
166. Ruiz, P.J., H. Zinger, and E. Mozes, Effect of injection of anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies on the development of experimental systemic lupus erythematosus in mice. *Cell Immunol*, 1996. 167(1): p. 30-7.
167. You, S., et al., Induction of allograft tolerance by monoclonal CD3 antibodies: a matter of timing. *Am J Transplant*, 2012. 12(11): p. 2909-19.
168. Kuttler, B., et al., Temporary anti-CD25/CsA therapy induces a CD4+ T-cell-mediated tolerance in BB/OK rats. *J Autoimmun*, 1996. 9(3): p. 321-9.
169. Janeway, C.A., Jr., The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 1992. 10: p. 645-74.
170. Horneff, G., et al., Persistent depletion of CD4+ T cells and inversion of the CD4/CD8 T cell ratio induced by anti-CD4 therapy. *J Rheumatol*, 1992. 19(12): p. 1845-50.
171. Darby, C.R., et al., Nondepleting anti-CD4 antibodies in transplantation. Evidence that modulation is far less effective than prolonged CD4 blockade. *Transplantation*, 1994. 57(10): p. 1419-26.
172. Gahring, L.C., et al., Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain. *Neuroimmunomodulation*, 1996. 3(5): p. 289-303.
173. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 2007. 96: p. 41-101.
174. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 137-61.
175. Seddon, B., et al., CD4(+)CD8(-) thymocytes that express L-selectin protect rats from diabetes upon adoptive transfer. *European Journal of Immunology*, 1996. 26(11): p. 2702-2708.
176. Siegling, A., et al., A nondepleting anti-rat CD4 monoclonal antibody that suppresses T helper 1-like but not T helper 2-like intra-graft lymphokine secretion induces long-term survival of renal allografts. *Transplantation*, 1994. 57(3): p. 464-7.
177. Vincenz L., et al., Cytokine-Induced β -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus, in *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments* 2011, InTech.
178. Jorns, A., et al., Anti-TCR therapy combined with fingolimod for reversal of diabetic hyperglycemia by beta cell regeneration in the LEW.1AR1-iddm rat model of type 1 diabetes. *J Mol Med (Berl)*, 2014.

Danksagung

In dieser Danksagung möchte ich zuerst Herrn Prof. Dr. Markus Tiedge für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas und der Chance zur Promotion am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie danken. Weiterhin bedanke ich mich für seine fachliche Betreuung und die Möglichkeit, die im Rahmen dieser Doktorarbeit entstandenen Forschungsergebnisse, auf nationalen und internationalen Fachkongressen vorstellen zu dürfen sowie auch Erfahrung im Umgang mit der Lehre in der Biochemie zu gewinnen.

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Hubert Bahl sich bereit erklärt zu haben, die Vertretung vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät für diese Arbeit übernommen zu haben.

Frau Prof. Dr. Simone Baltrusch danke ich für die stets konstruktive Beratung bei aufkommenden Problemen in Arbeitsbesprechungen oder in Vorbereitung von Kongressbeiträgen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Dirk Koczan, aus der Immunologie, für die Hilfe beim Umgang mit dem Realtime-PCR Gerät und bei der Auswertung der generierten Rohdaten.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Füllen und Herrn Dr. Rainer Schmidt, aus der Bioinformatik, für die Zusammenarbeit bei der bioinformatischen Aufarbeitung der Genexpressionsdaten.

Bei Frau Dr. Heike Weiss bedanke ich mich recht herzlich für die super Doktorandenbetreuung über die gesamte Zeit hinweg. Sie hatte stets ein offenes Ohr, sowohl theoretische als auch praktische Probleme mit mir zu lösen und half auf dem langen Weg zur Promotion so manches arbeitsrelevante Motivationsloch bei unseren lieb gewonnenen Rattis mit der entsprechenden Heiterkeit zu bewältigen.

Im Hinblick auf zahlreiche praktische Arbeiten die vom Anfertigen von Gewebeschnitten bis zur Versorgung unserer kleinen Diabetiker reichte, möchte ich mich herzlich bei Annett Kott, Sigrid Giers, Lisa Wengler, Claudia Fahle dem tierpflegenden Personal des Tierhauses im Institut für experimentelle Tierchirurgie und dem Personal der medizinischen Pathologie bedanken.

Heike, Anja, Mandy und Susanne! danke ich für das bestimmt manchmal mühsame kritische Korrekturlesen der Arbeit.

Ich bedanke mich auch bei Frau Kerschies für ihre organisatorische Hilfe keine Fristen und Details bei Anträgen zu vergessen.

Meinen lieb gewonnenen „Doktorandenleidensgenossen“ Jan, Susanne, Linda und Franziska danke ich für das besonders freundschaftliche Kollegenverhältnis und auch für die vielen schönen Erlebnisse auf Dienstreisen und natürlich auch abseits der Arbeit vom Fußballspiel bis zum Sinnieren über diverse Sinnlosigkeiten bei einem Gläschen Ethylalkohol!!!

Im Ganzen möchte ich mich nochmal bei der gesamten Laborgemeinschaft (nicht zu vergessen die noch nicht namentlich erwähnten Julia Schultz, Rica Waterstradt, Cindy Johne, Tom BÜchse und Thomas Bittorf) für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft untereinander auch im Hinblick auf die Entstehung dieser Arbeit recht herzlich bedanken. Jeder hat irgendwann, irgendwie und irgendetwas Gutes dazu beigetragen. Und sei es eine Idee, die bei einem Schwatz auf dem Flur entstanden ist. Es war eine nicht stressfreie aber trotzdem tolle Zeit ☺.

Mein persönlicher Dank gilt meiner ganzen Familie, die zuerst das wissenschaftliche Interesse, durch das Bestimmen von Vögeln, frühkindlich geweckt haben...später auch im Rahmen finanzieller Unterstützung das Studium ermöglicht und das Leben erleichtert und auch die Unterstützung in schwierigen Zeiten nicht abreißen lassen haben.

Zum Schluss geht mein persönlichster Dank an meine liebe Frau Nicole die mich bekräftigt hat die Bewerbung für diese Doktorandenstelle zu schreiben, um diese Chance wahrnehmen zu können...Weiterhin bedanke ich mich sehr bei dir für deine liebevolle, aufbauende, antreibende Art und Weise die emotional schwierigen Zeiten während der Doktorarbeit gut zu überstehen und es auch mit deiner Unterstützung zu einem positiven Ende zu bringen. DANKE.

„Es ist ein lobenswerter Brauch: Wer was Gutes bekommt, der bedankt sich auch.“

Wilhelm Busch

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, 2014

Thomas Schöppe