

Aus dem Institut für Immunologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
und  
dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Der Streptozotozin-induzierte  
Diabetes in der  
transgenen CD4/DR17-Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Thure Adler  
aus Mainz

Leipzig, 2002

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

*Dekan*

Prof. Dr. Gotthold Gäbel

*Betreuer*

Prof. Dr. Gottfried Alber, Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät,  
Universität Leipzig

Dr. habil. Ulrich Sack, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin,  
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

*Gutachter*

Prof. Dr. Gottfried Alber, Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät,  
Universität Leipzig

Dr. habil. Ulrich Sack, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin,  
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Herbert Fuhrmann, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut,  
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Bernd Kaspers, Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung,  
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

*Tag der Verteidigung*

29.10.2002

# Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Literaturübersicht	
2.1	<b>Der Typ 1 Diabetes. Ein Überblick</b>	2
2.2	<b>Autoimmunität und Bedeutung der T-Zellen beim Typ 1 Diabetes</b>	6
2.3	<b>Anti-CD4-Ak-Therapie des Typ 1 Diabetes</b>	12
2.4	<b>Tiermodelle des Typ 1 Diabetes</b>	14
2.5	<b>Der Streptozotozin-induzierte Diabetes</b>	16
3	Tiere, Material und Methoden	
3.1	<b>Das CD4/DR17-transgene Mausmodell</b>	
3.1.1	<i>Beschreibung des CD4/DR17-transgenen Mausmodells</i>	21
3.1.2	<i>Eingesetzte transgene Tiere</i>	22
3.2	<b>Materialien</b>	
3.2.1	<i>Chemikalien, Medien, Medienzusätze</i>	23
3.2.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	24
3.2.3	<i>Geräte</i>	25
3.2.4	<i>Antikörper</i>	26
3.2.5	<i>Rezepturen</i>	27
3.3	<b>Methoden</b>	
3.3.1	<i>STZ-Behandlung</i>	30
3.3.2	<i>Blutglukosebestimmung</i>	30
3.3.3	<i>Tötung der Maus und Organentnahme</i>	31
3.3.4	<i>Präparation von Organen zur histologischen Untersuchung</i>	31
3.3.5	<i>Übersichtsfärbung histologischer Schnitte</i>	32
3.3.6	<i>Immunhistologische Färbung</i>	33

	Seite	
3.3.6.1	<i>Immunhistologische Detektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf Kryostatschnitten mit der Biotin-Avidin-Peroxidase Technik</i>	33
3.3.6.2	<i>Immunhistologischer Nachweis von Insulin mit der indirekten Alkalischen Phosphatase Technik</i>	33
<b>3.3.7</b>	<b><i>Durchflußzytometrische Bestimmung von Lymphozytenpopulationen und Aktivierungsmarkern</i></b>	<b>34</b>
3.3.7.1	<i>Durchflußzytometrische Analyse des Blutes</i>	35
3.3.7.2	<i>Durchflußzytometrische Analyse von Milzzellen</i>	35
<b>3.3.8</b>	<b><i>Zellkulturtechniken</i></b>	<b>36</b>
<b>3.3.9</b>	<b><i>Hybridomzellkultur zur Gewinnung monoklonaler Antikörper</i></b>	<b>36</b>
<b>3.3.10</b>	<b><i>In vivo-Behandlung mit monoklonalen Antikörpern</i></b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>4.1</b>	<b>Voruntersuchungen</b>	
4.1.1	<i>Festlegung eines Schwellenwertes für den Begriff der Hyperglykämie bei CD4/DR17-Mäusen</i>	40
4.1.2	<i>Der Orale Glukose-Toleranz-Test bei unbehandelten CD4/DR17-Mäusen</i>	41
4.1.3	<i>Immunhistochemische Bestimmung des Insulingehaltes von Langerhans'schen Inseln</i>	42
4.1.4	<i>Das Auftreten und die Beurteilung einer Insulitis</i>	43
4.1.5	<i>Immunhistochemische Detektion von CD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz</i>	45
4.1.6	<i>Durchflußzytometrische Analyse des Blutes von CD4/DR17-Mäusen und transgenen Segreganten</i>	45
4.1.7	<i>Aufreinigung eines monoklonalen, gegen das murine CD8-Molekül gerichteten Antikörpers aus dem Kulturüberstand des Hybridoms 53.6.72</i>	46
<b>4.2</b>	<b>Diabetogene Wirkung des STZ in der CD4/DR17-Maus</b>	<b>48</b>
4.2.1	<i>Entwicklung des Blutglukosespiegels der CD4/DR17-Maus nach STZ-Behandlung</i>	48

	Seite	
4.2.2	<i>Zunahme der Fläche unterhalb der Blutglukosekurve des OGTT nach STZ-Behandlung</i>	49
4.2.3	<i>Das Auftreten von Hyperglykämie in der CD4/DR17-Maus nach Verabreichung unterschiedlicher Mengen STZ</i>	50
4.3	<b>Induktion eines Diabetes in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten</b>	51
4.3.1	<i>Vergleich der Diabetesentwicklung zwischen CD4/DR17-Mäusen und transgenen Segreganten nach Behandlung mit 5x40 mg/kg STZ</i>	52
4.3.2	<i>Vergleich der Diabetesentwicklung zwischen CD4/DR17-Mäusen und transgenen Segreganten nach Behandlung mit 1x80 und 4x40 mg/kg STZ</i>	53
4.3.2.1	<i>Verlauf der Blutglukose nach STZ-Behandlung in CD4/DR17-Mäusen und transgenen Segreganten</i>	54
4.3.2.2	<i>Auswirkungen der STZ-Behandlung in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten auf die orale Glukose-Toleranz</i>	57
4.3.2.3	<i>Auswirkungen der STZ-Behandlung in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten auf den Anteil insulinhaltiger Zellen in Pankreas-Inseln</i>	58
4.3.2.4	<i>Auftreten von Insulitiden in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten nach STZ-Behandlung</i>	58
4.3.2.5	<i>Immunhistochemischer Nachweis von eingewanderten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Pankreas-Inseln STZ-behandelter CD4/DR17-Mäuse</i>	60
4.4	<b>Einfluß der Verabreichung von Antikörpern, die gegen das CD4- oder CD8-Molekül gerichtet sind, auf den Verlauf eines STZ-induzierten Diabetes in der CD4/DR17-Maus</b>	61
4.4.1	<i>Verlauf der Blutglukosewerte in STZ- und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen</i>	61
4.4.2	<i>Der Orale Glukose-Toleranz-Test bei STZ- und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen</i>	62
4.4.3	<i>Bestimmung des Insulingehaltes in den Inseln von STZ- und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen</i>	63
4.4.4	<i>Das Auftreten von Insulitiden in STZ- und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen</i>	64

	Seite	
<b>4.4.5</b>	<b><i>Durchflußzytometrische Analyse des Blutes und der Milzen STZ- und Antikörper-behandelter CD4/DR17-Mäuse</i></b>	65
4.4.5.1	<i>Durchflußzytometrische Analyse des Blutes STZ- und Antikörper-behandelter CD4/DR17-Mäuse</i>	65
4.4.5.2	<i>Durchflußzytometrische Analyse der Milzen STZ- und Antikörper-behandelter CD4/DR17-Mäuse</i>	66
<b>4.5</b>	<b>Einfluß eines STZ-induzierten Diabetes in der CD4/DR17-Maus auf die Expression von Aktivierungsmarkern auf Blutlymphozyten</b>	67
5	Diskussion	69
<b>5.1</b>	<b>Hyperglykämie bei der STZ-behandelten CD4/DR17-Maus</b>	69
<b>5.2</b>	<b>Verlust insulinhaltiger Inselzellen bei der STZ-behandelten CD4/DR17-Maus</b>	71
<b>5.3</b>	<b>Das Auftreten von Insulitiden bei der STZ-behandelten CD4/DR17-Maus</b>	71
<b>5.4</b>	<b>Vergleich der STZ-Wirkung in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten</b>	72
<b>5.5</b>	<b>Beeinflussung des STZ-induzierten Diabetes der CD4/DR17-Maus mittels anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörperbehandlung</b>	75
<b>5.6</b>	<b>Expression von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten STZ-behandelter CD4/DR17-Mäuse</b>	78
<b>5.7</b>	<b>Abschließende Betrachtungen</b>	79
6	Zusammenfassung	81
<b>6.1</b>	<b>Summary</b>	83
7	Literaturverzeichnis	84-102

## Verwendete Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>anti-</b>	Gerichtet gegen
<b>APC</b>	Antigenpräsentierende Zelle
<b>aqua dest</b>	Destilliertes Wasser
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>BG</b>	Blutglukosewert
<b>B-Lymphozyt</b>	Bursa-Fabrizii-Lymphozyt
<b>BSA</b>	Rinderserum-Albumin
<b>B-Zelle</b>	B-Lymphozyt
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>CD</b>	cluster of differentiation (Zellmarker)
<b>CD3<sup>+</sup> Zelle</b>	T-Zelle
<b>CD4<sup>+</sup> T-Zelle</b>	CD4-positive T-Zelle, T-Helfer-Zelle
<b>CD4<sup>-</sup></b>	CD4-defizient
<b>CD4<sup>-</sup>/DR17-Maus</b>	CD4-defiziente Maus mit transgenem DR17
<b>CD4/DR17-Maus</b>	Maus mit transgenem humanem CD4 und DR17 und ohne murinem CD4
<b>CD8<sup>+</sup> T-Zelle</b>	CD8-positive T-Zelle, zytotoxische T-Zelle
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>COX-2</b>	Zyko-Oxygenase 2
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorter (Fluoreszenz-aktiviertes Zelltrenngerät)
<b>FACS-Puffer</b>	Pufferlösung zur FACS-Färbung
<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluoreszein-isothiocyanat
<b>FL</b>	Fluoreszenz

<b>g</b>	Gramm
GAD65	65 Kilodalton Glutaminsäuredecarboxylase
GLUT	Glukosetransporter
<b>h</b>	Stunde
hCD4	humanes CD4,
hCD4-Maus	Maus mit transgenem humanem CD4
HCl	Salzsäure
HD-STZ	Hochdosiertes STZ
HE	Hämalaun Eosin
HLA	humanes lymphozytäres Antigen
HRP	Meerrettich Peroxidase
Hsp60	60 Kilodalton Hitzschockprotein
<b>IA</b>	Inselzellantigen
IFN	Interferon
IgG	Gamma-Immunglobulin
IKIT	Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthetase
<b>kg</b>	Kilogramm
K.G.	Körpergewicht
<b>l</b>	Liter
Lsg.	Lösung
<b>mAk</b>	Monoklonaler Antikörper
MF	Mittlere Fluoreszenz
mg	Milligramm
MHC	Main histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MLD	Multiple low dose (mehrfache Niedrigdosen)
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mur	Murin (Maus-)
<b>NA</b>	Nikotinamid

nm	Nanometer
NO	Stickstoffoxid
NOD	Non-obese diabetic
<b>OGTT</b>	Oraler Glukose-Toleranz- Test
<b>PARP</b>	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
Pe-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin-5.1
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RPMI-10	Supplementiertes RPMI mit 10% FKS (siehe 3.1.1.)
RT	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
SCID	Severe combined immune deficiency (schwerer kombinierter Immunmangel)
STZ	Streptozotozin
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan
T-Zelle	Thymusabhängiger Lymphozyt
<b>UV</b>	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen pro Minute
<b>µg</b>	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer



## 1. Einleitung und Zielstellung

Eine bestimmte Form der Zuckerkrankheit, der Diabetes mellitus vom Typ 1, wird als chronische organspezifische Autoimmunerkrankung angesehen, bei welcher die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas wahrscheinlich infolge von Effektormechanismen aktivierter Immunzellen zerstört werden. Bisher ist nicht völlig geklärt, wie und durch welche Zellen dieser Prozeß ausgelöst wird. Ebenso wenig gibt es eine Standardtherapie, die den einmal begonnenen Krankheitsprozeß aufhalten kann.

Mit verschiedenen experimentellen Krankheitsmodellen werden intensive Untersuchungen zur Pathogenese der Krankheit durchgeführt. Dabei hat sich unter anderem eine zentrale Rolle der CD4-positiven, thymusabhängigen Helfer-Lymphozyten ( $CD4^+$  T-Zellen) herausgestellt. Transgene Tiere, die menschliche Oberflächenmoleküle exprimieren, bieten die Möglichkeit, in solchen Modellen Therapieansätze zu erproben, die auf diese Moleküle zielen.

An der Universität Leipzig ist eine mehrfach transgene Mauslinie (CD4/DR17-Maus) etabliert worden, in der das murine CD4-Gen inaktiviert wurde und welche das menschliche CD4-Molekül (hCD4) auf T-Helfer-Zellen sowie das menschliche HLA-DR17, einen möglichen Interaktionspartner für hCD4, auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert.

Im Hinblick auf den Einsatz dieser Mauslinie in zukünftigen vorklinischen Studien über die therapeutische Wirkung von spezifischen gegen das humane CD4-Molekül gerichteten Antikörpern beim Typ 1 Diabetes, sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

Ist in transgenen CD4/DR17-Mäusen ein Diabetes mellitus mittels mehrfacher niedriger Dosen von Streptozotocin (MLD-STZ-Diabetes) induzierbar, der geeignet ist, als Modell für den menschlichen Typ 1 Diabetes zu dienen?

Sind die transgenen Moleküle hCD4 und DR17 an der Pathogenese eines MLD-STZ-Diabetes in der CD4/DR17-Maus beteiligt?

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Der Typ 1 Diabetes. Ein Überblick

Der Diabetes mellitus ist eine bereits in der Antike bekannte Erkrankung, die schon zu jener Zeit durch die dabei auftretende vermehrte Urinausscheidung (Polyurie) und den zuckerhaltigen Urin (Glukosurie) diagnostiziert wurde. Die Bedeutung des Pankreas an der Regulation des Zuckers im Stoffwechsel wurde jedoch erst Ende des 19. Jahrhunderts erkannt, nachdem Minkowski ein bereits im 16. Jahrhundert durchgeführtes und in Vergessenheit geratenes Experiment wiederholte. Er zeigte, dass durch Entfernen der Bauchspeicheldrüse bei Tieren ein Diabetes mellitus erzeugt wird (SCHADEWALDT, 1975). Weitere wichtige Erkenntnisse waren die Entdeckung der Langerhans'schen Inseln und deren Funktion als Bildungsstätte der Hormone Glukagon und Insulin, welche im Zusammenspiel die Blutglukose regulieren. Eine bestimmte Form des Diabetes mellitus, der insulinabhängige Diabetes, konnte damit auf einen Insulinmangel zurückgeführt werden. Durch die Insulin-Substitutionstherapie hat sich das Krankheitsbild dieser sonst frühzeitig zum Tode führenden Stoffwechselstörung schließlich in ein komplexes chronisches Syndrom gewandelt (GOTTHARD, 1993).

In der heutigen Forschung steht die Suche nach der Krankheitsursache im Vordergrund. Aufgrund des histologischen Befundes, dem zufolge bei bestimmten Diabetikern Leukozytenansammlungen um zerstörte  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse (Insulitis) auftreten (VON MEYENBURG, 1940), wird seit den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts vermutet, dass die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen von Immunzellen zerstört werden (Autoimmunerkrankung) (GEPTS, 1965). Typische klinische Erscheinungen wie Polyurie mit Durst, Leistungsabfall und Gewichtsverlust treten auf, wenn bereits der größte Teil der  $\beta$ -Zellen zerstört ist (GEPTS u. LECOMPTE, 1981).

Der Diabetes mellitus wird in Krankheitstypen unterteilt. Der insulinabhängige Diabetes mellitus vom Typ 1 (Typ 1 Diabetes) ist gekennzeichnet durch den Zusammenbruch der Blutglukoseregulation, durch Hyperglykämie, den Mangel an Insulin und dem Vorkommen von Antikörpern (Ak) gegen Antigene der  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas (Inselzell-Autoantikörper). Diese treten schon Jahre vor den ersten klinischen Symptomen auf und werden als Ausdruck eines langsamen und progressiven Autoimmunprozesses gedeutet.

Nach den aktuellen Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird der Typ 1 Diabetes vom Typ 2 Diabetes, dem Schwangerschaftsdiabetes und weiteren spezifischen Diabetestypen abgegrenzt. Dazu zählen der Diabetes aufgrund genetischer Defekte

hinsichtlich der Insulinproduktion bzw. -funktion, sowie aufgrund von Traumen, Endokrinopathien, Infektionen, Chemikalienwirkung und als Begleiterscheinung verschiedener Syndrome (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 1997). Während beim Typ 1 Diabetes eine Zerstörung der  $\beta$ -Zellen vorliegt, tritt beim Typ 2 Diabetes Hyperglykämie als Folge einer Insulinresistenz auf. Der klassische Typ 1 Diabetes mit vermuteter Autoimmunpathogenese wird weiterhin abgegrenzt vom Typ 1 Diabetes mit unbekannter Ursache (ohne Inselzell-Autoantikörper). Der Typ 1 Diabetes betrifft etwa zehn Prozent aller Diabetes mellitus Patienten (LEHMANN u. SPINAS, 2000). Da sich auch der Typ 2 Diabetes in einen Typ 1 Diabetes entwickeln kann, wurde von WILKIN (2001) die Hypothese geäußert, dass beiden Diabetesformen gemeinsame Pathogenesemechanismen zugrunde liegen könnten.

Auch in der Tiermedizin hat der Diabetes mellitus eine große Bedeutung, da Tiere, die einem insulinabhängigen Glukosestoffwechsel unterliegen, einen insulinabhängigen Diabetes entwickeln können (FISCHER, 1994). Für diesen wird in der veterinärmedizinischen Literatur der Begriff des Typ 1 Diabetes häufig synonym gebraucht; ob ein bei Haustieren diagnostizierter Insulinmangel auf der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch Immunmechanismen beruht, wurde aber nur in Einzelfällen nachgegangen. So konnten HAINES u. PENHALE (1985) durch den Nachweis von Inselzell-Autoantikörper belegen, dass beim Hund ein Diabetes mellitus mit einer Autoimmunkomponente vorkommt. In einer Studie an Pankreata von 30 spontan-diabetischen Hunden und 5 spontan-diabetischen Katzen ließen sich jedoch nur in Pankreasschnitten einer Katze lymphozytäre Infiltrationen darstellen (GEPTS u. TOUSSAINT, 1967). Der insulinabhängige Diabetes bei Hunden tritt häufiger als sekundärer Diabetes in Folge einer Pankreatitis auf. Ebenso ist eine vererbte Form ohne Anzeichen von Entzündungskomponenten beschrieben worden (KRAMER et al., 1980). Bei Rindern konnte ein mit einer Insulitis einhergehender Diabetes im Jahre 1964 von Renold, Soeldner und Steinke durch Immunisierung mit Insulin hervorgerufen werden; ein Experiment, welches von GREINER et al. (2001) als das erste Tiermodell für einen immunvermittelten Diabetes bezeichnet worden ist.

Aus der Assoziation der Erkrankung mit bestimmten auf der Oberfläche von Leukozyten exprimierten Glykoproteinen, den MHC-Molekülen, die von Genorten des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse II kodiert werden (SHE, 1996), ist eine zentrale Bedeutung der  $CD4^+$  T-Zellen für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes hergeleitet worden (CHOUDHURI u. VERGANI, 1998). Die  $CD4^+$  T-Zelle wird aktiviert

durch die MHC-Klasse II-abhängige Präsentation immunogener Peptide (CRESSWELL, 1994) und unterstützt u. a. durch Sezernierung von Zytokinen die Immunantwort. Diese Zytokine wirken verstärkend auf Funktionen der Makrophagen und sind gleichfalls an der Aktivierung der B-Lymphozyten und der zytotoxischen thymusabhängigen Lymphozyten ( $CD8^+$  T-Zellen) beteiligt. Makrophagen und  $CD8^+$  T-Zellen sind in der Lage, direkt  $\beta$ -Zellen zu zerstören (siehe 2.2.).

Bei der Suche nach den Antigenen, die während des Immunprozesses präsentiert werden, wurde eine Vielzahl von Autoantigenen entdeckt. Gegen solche wird im Verlauf eines Typ 1 Diabetes eine humorale und zelluläre Immunantwort entwickelt (HARRISON et al., 1992). Aus dieser Gruppe sind vor allem das Insulin (WEGMANN u. EISENBARTH, 2000), die Glutaminsäuredecarboxylase GAD65 (YOON et al., 2000) sowie die Inselzellantigene IA2 und IA-2 $\beta$  (LAN et al., 1996) eingehend erforscht worden. Sie erlangten dadurch in der Diagnostik zunehmend an Bedeutung. Bis heute ist jedoch nicht erwiesen, dass einem dieser Autoantigene eine essentielle Rolle bei der Auslösung des Krankheitsprozesses zukommt (BAEKESKOV et al., 2000).

Neben den MHC-Genen wurden weitere Gene gefunden, welche die Veranlagung zum Diabetes bedingen (DAVIES et al., 1994). Bestimmte Gene dieser Gruppe kodieren wahrscheinlich für Moleküle, die an der Immunregulation beteiligt sind (NERUP et al., 1987). Die Fehlregulation von Entzündungsmediatoren und Zytokinen trägt aufgrund der besonderen Empfindlichkeit der  $\beta$ -Zellen zum  $\beta$ -Zell-Untergang bei (NERUP et al., 1994; SCOTT et al., 1994; SEEWALDT et al., 2000). So sind  $\beta$ -Zellen besonders empfindlich gegenüber Stickstoffoxid (NO), dessen Produktion in den Inseln von Endothelzellen (SUSCHEK et al., 1994), Makrophagen und möglicherweise von  $\beta$ -Zellen selbst durch Zytokine hervorgerufen werden kann (NERUP et al., 1994). Bestimmte Zytokine wirken auch direkt  $\beta$ -Zell-toxisch. Dies ist für Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) beschrieben (DELANEY et al., 1997). Die wachsende Kenntnis über typische Zytokin-Sekretionsmuster der T-Zellen führte zur Einteilung der  $CD4^+$  T-Zellen in sogenannte T-Helfer-1 (Th1) und T-Helfer-2 (Th2) -Zellen (MOSMANN u. SAD, 1996). Th1-Zellen produzieren u.a. die Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$ , während in Th2-Zellen u.a. die Produktion von IL-4 und IL-10 dominiert. Die Wirkungen der Th1-Zytokine bestehen vor allem in der Unterstützung einer zellulären Immunantwort; insbesondere werden Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aktiviert. Th2-Zellen wirken durch ihre Zytokine dagegen effektiver in der Stimulation einer humoralen Immunantwort und sind in der Lage,

die zelluläre Immunantwort zu unterdrücken. Das Konzept, nach welchem die Entwicklung des Typ 1 Diabetes von Th1-Zellen abhängt (LIBLAU et al., 1995), konnte durch Tierexperimente bestätigt werden (BRADLEY et al., 1999). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass sich ein spontaner Autoimmundiabetes auch unter dem Einfluss von Th2-Zellen entwickeln kann (SERREZE et al., 2000; PAUZA et al., 2001; SERREZE et al., 2001).

Das Erkrankungsrisiko für eineiige Zwillingsgeschwister von Typ 1 diabetischen Patienten wird aus epidemiologischen Studien auf nur ca. 40% geschätzt (KUMAR et al., 1993). Dies mag zu einem Teil auf Mutationen einzelner Gene beruhen, die einen protektiven Einfluß gegenüber dem Erkrankungsrisiko ausüben (KRETOWSKI u. KINALSKA, 2000). Auf der anderen Seite weist dies darauf hin, dass bei der Entstehung der Krankheit außer genetische auch exogene Faktoren eine Rolle spielen. In Tiermodellen konnte ein Einfluß der Fütterungsdiäten auf die Diabetesinzidenz gezeigt werden (SCOTT et al., 1988). Möglicherweise zählen auch Viruserkrankungen zu den krankheitsauslösenden Faktoren (YOON, 1991). Ebenso wurde die Beteiligung endogener Genprodukte von Retroviren, insbesondere Superantigene, an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes beschrieben (CONRAD et al., 1997).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die gegenwärtige Forschung den Typ 1 Diabetes als Folge eines komplexen Krankheitsprozesses darstellt. Dieser entwickelt sich aus dem Zusammenspiel exogener und endogener Faktoren sowie dem Ausbleiben z. T. noch unbekannter Regulationsmechanismen zur Suppression autoaggressiver Immunantworten (FREIESLEBEN DE BLASIO et al., 1999).

## 2.2. Autoimmunität und Bedeutung der T-Zellen beim Typ 1 Diabetes

Im gesunden Organismus besteht eine immunologische Nichtreaktivität (Toleranz) gegenüber körpereigenen Antigenen. Sie ist die Folge eines mehrstufigen Selektionsprozesses, dem sowohl das T-Zell-Rezeptor (TCR)- als auch das B-Zell-Rezeptor-Repertoire unterliegen. Dieser findet für T-Zellen im Thymus und für B-Zellen im Knochenmark statt. Zellen, welche trotzdem körpereigene Antigene erkennen können, sind im gesunden Organismus entweder anergisch, unterstehen einer peripheren Regulation oder übernehmen selbst Funktionen als regulierende Lymphozyten. Der Autoimmunität kommt im gesunden Organismus außerdem eine Funktion bei der Regeneration von Geweben zu (SCHWARTZ u. COHEN, 2000).

Der Begriff der Autoimmunerkrankung steht für die pathologische Immunreaktion gegen körpereigene Antigene. Eine Autoimmunerkrankung entwickelt sich, wenn Toleranz-induzierende oder –erhaltende Mechanismen versagen (JANEWAY u. TRAVERS, 1997).

Die folgenden Befunde weisen darauf hin, dass es sich beim menschlichen Typ 1 Diabetes wahrscheinlich um eine Autoimmunerkrankung handelt:

1. Histologische Untersuchungen zeigen die Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen in die Langerhans'schen Inseln (FOULIS et al., 1991).
2. Es sind Inselzell-Autoantikörper nachweisbar (MARNER et al., 1991); dabei werden unter anderem Epitope des GAD65, des Insulin und des IA2 (VERGE et al., 1998) erkannt.
3. Es besteht eine Assoziation zwischen bestimmten MHC-Haplotypen und dem Typ 1 Diabetes beim Menschen (SHE, 1996) sowie dem spontanen Diabetes der Non Obese Diabetic (NOD)-Maus (SERREZE u. LEITER, 1994).
4. Es sind reaktive T-Zellen gegen Inselzellautoantigene (PEAKMAN et al., 1994), insbesondere gegen GAD65, vorhanden (LOHMANN et al., 1996).
5. Aus der Transplantationsmedizin sind Fälle bekannt, bei welchen durch Knochenmarktransplantation ein Typ 1 Diabetes übertragen wurde (LAMPETER et al., 1993).
6. Therapieerfolge mit Immunsuppressiva haben die Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes bestätigt (WILSON u. EISENBARTH, 1990).

Histologisch können bei Typ 1 diabetischen Patienten Leukozyteninfiltrate in den Langerhans'schen Inseln (Insulitis) nachgewiesen werden. In diesen Insulitiden werden neben Makrophagen und B-Zellen sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert. Dies wurde in Studien sowohl beim menschlichen Typ 1 Diabetes (SHIMADA et al., 1999) als auch in der NOD-Maus detailliert dargestellt (HAWKINS et al., 1996). Eine Insulitis führt beim Menschen allerdings nicht zwangsläufig zu einem Typ 1 Diabetes (LAMPETER et al.,

1994). In der NOD-Maus sind bereits alternative Genloci identifiziert, die zur Ausprägung einer Insulinitis bzw. einer Hyperglykämie beitragen (PROCHAZKA et al., 1987). Das Auftreten eines Diabetes wird als die Folge einer zerstörenden Insulinitis angesehen, die sich von einer nicht-zerstörenden (benignen) Insulinitis unterscheiden lässt (DILTS u. LAFFERTY, 1999). Für die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen sind sowohl  $CD4^+$  (MORA et al., 1999) als auch  $CD8^+$  T-Zellen (BALASA et al., 1998) wichtig. Die Unterscheidung einer benignen von einer zerstörenden Insulinitis wurde u.a. aus der Beobachtung abgeleitet, dass sich in männlichen NOD-Mäusen seltener ein Diabetes entwickelt als in weiblichen Tieren, obwohl Mäuse beider Geschlechter Insulinitiden aufweisen (HAWKINS et al., 1996). Androgene scheinen dabei eine protektive Rolle zu spielen, da eine Kastration bei Männchen zu einer Steigerung der Diabetesinzidenz führt (MAKINO et al., 1981). Es konnte gezeigt werden, dass die geschlechtsspezifische Differenz nicht auf einer größeren Resistenz der Inselzellen beruht, sondern auf unterschiedlichen Eigenschaften der in die Inseln einwandernden Lymphozyten (ABLAMUNITS et al., 1999) bzw. deren Zytokin-Sekretionsmuster. So ist bei den Weibchen die TNF- $\beta$ - und IFN- $\gamma$ -Produktion während der Insulinitis größer (HIRAI et al., 2000). Eine besondere Rolle wurde außerdem für den Faktor TNF- $\alpha$  erkannt, welcher von Makrophagen gebildet wird, und für das Auftreten einer zerstörenden Insulinitis essentiell ist (PAKALA et al., 1999). Seine transgene Expression in Inselzellen führt jedoch nur zu einer benignen Insulinitis (HIGUCHI et al., 1992). Dem Zytokin IFN- $\gamma$  kommt eine besondere Bedeutung im Rahmen der Insulinitis dadurch zu, dass es die MHC-Klasse I-Expression auf  $\beta$ -Zellen hervorruft, wodurch die Zellen von  $CD8^+$  T-Zellen erkannt werden können (KAY et al., 1991). IFN- $\gamma$  wird vor allem von Th1-Zellen produziert und außer seiner direkten  $\beta$ -Zell-toxischen Wirkung (SEEWALDT et al., 2000) besteht sein entzündungsfördernder Effekt bei einer Insulinitis in der „aktivierenden“ Wirkung auf Makrophagen, die dadurch ihrerseits TNF- $\alpha$  sezernieren. Diese Zellpopulation scheint essentiell für die Initiierung eines spontanen Autoimmundiabetes zu sein, denn sie tritt auf, bevor antigenspezifische Mechanismen stattfinden (LEE et al., 1988). Weiterhin sind Makrophagen an der Aktivierung der Th1-Zellen und der  $CD8^+$  T-Zellen beteiligt (JUN et al., 1999). Durch Zytokine und Mediatoren sind Makrophagen in der Lage  $\beta$ -Zellen zu schädigen (SCHWIZER et al., 1984) und durch die Sekretion von Chemokinen induzieren sie die Expression von Adhäsionsmolekülen im Gewebe und locken weitere Entzündungszellen in die Langerhans'schen Inseln (HUTCHINGS et al., 1990). Die Ansammlung von Lymphozyten in den Inseln ist daher nicht auf solche beschränkt, die spezifisch  $\beta$ -Zell-Autoantigene erkennen (FAVEEUW et al., 1995). Auch den dendritischen

Zellen kommt als antigenpräsentierenden Zellen eine besondere Bedeutung zu. Das Zytokinmuster dieser Zellen ist wahrscheinlich ein Teil der Regulationsmechanismen der peripheren Toleranz. Bei der NOD-Maus scheinen Reifungsstörungen der dendritischen Zellen und Makrophagen vorzuliegen, was möglicherweise zum Ausbruch einer krankmachenden Autoimmunität beiträgt. Die therapeutische Wirkung von IL-4 beim spontanen Diabetes der NOD-Maus könnte somit auch durch den Einfluß dieses Zytokins auf die Differenzierung solcher Zellen erklärt werden (KING et al., 2001).

Antigenspezifische zelluläre Immunantworten erfordern die Erkennung eines Antigens von Peptidgröße durch den TCR. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen bestimmte Peptide erst, wenn sie im Komplex mit MHC-Molekülen präsentiert werden. Für die vollständige Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden zwei synergistische Signale benötigt (JANEWAY u. TRAVERS, 1997). Das erste Signal ist antigenspezifisch und entsteht durch die Bindung des TCR der T-Zelle an den Antigen (Peptid)-MHC-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC). Das zweite Signal ist nicht antigenspezifisch. Es wird ausgelöst durch die Bindung von CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen mit den B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) - Molekülen, die von APC exprimiert werden. Aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezernieren IL-2, welches die CD4<sup>+</sup> T-Zelle selbst (autokrin) sowie benachbarte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (parakrin) zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Ebenso dient dieser Wachstumsfaktor CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Differenzierung in zytotoxische Effektorzellen. Diese lösen mittels des Perforins (THOMAS u. KAY, 2000) oder spezieller Fas-/Fas-Ligand-Bindungen den apoptotischen Zelltod der  $\beta$ -Zellen aus (SU et al., 2000).

Möglicherweise ist die Selektion des T-Zell-Rezeptor-Repertoires für die Auslösung der Krankheit entscheidend. Bei der NOD-Maus ist die Diabetesanfälligkeit, die mit den MHC-Klasse II-Genen gekoppelt ist, mit einem typischen T-Zell-Rezeptor-Repertoire und einer T-Zell-Reaktivität gegen ganz bestimmte Epitope des GAD65 verbunden (CHAO et al., 1999). Die MHC-Haplotypen entscheiden dabei im Rahmen der T-Zellen-Selektion im Thymus über das Auftreten oder die Deletion von autoreaktiven T-Zellen (SCHMIDT et al., 1997). Die transgene Expression humaner MHC-Klasse II-Moleküle, der DR3- und DQ8-Allele, welche beim Menschen mit dem Diabetesrisiko assoziiert sind, führte in der Maus zur Entwicklung von Insulitiden und zum Verlust der Toleranz gegenüber GAD65. Die Insulitis war jedoch nicht mit einer Diabetesentwicklung verbunden (ABRAHAM et al., 2000). Eine zerstörende Autoimmunität entstand jedoch in transgenen Mäusen mit dem humanen DQ8-Allel, wenn gleichzeitig eine transgen induzierte CD80-Expression auf den  $\beta$ -Zellen vorlag (WEN et al.,

2000). Offensichtlich müssen also außer den MHC-Klasse II-Haplotypen zusätzliche Voraussetzungen gegeben sein, um eine aggressive Autoimmunität in Gang zu setzen.

MHC-Moleküle des Menschen (HLA) sind stark polymorphe Glykoproteine. Sie sind beim Menschen durch Gene kodiert, die den menschlichen Histokompatibilitätskomplex (MHC) bilden. Gewisse HLA-Häufigkeiten, die bei Typ 1 Diabetes-Patienten auftreten, haben frühzeitig eine Verbindung der Erkrankung zu diesen Genen auf dem Chromosom 6 aufgezeigt. Die HLA-Moleküle werden in die Klassen I (HLA-A, B, C) und II- (HLA-DP, DQ, DR) Antigene unterteilt. MHC-Klasse I-Moleküle bestehen aus einer glykosilierten Polypeptidkette mit den Domänen  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ , welche nichtkovalent mit dem Polypeptid  $\beta 2$ -Mikroglobulin assoziiert ist. MHC-Klasse II-Moleküle hingegen bestehen aus 2 Glykoproteinen, der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette (JANEWAY u. TRAVERS, 1997).

Die mit dem menschlichen Diabetes assoziierten Gene innerhalb des HLA-Klasse II-Locus sind eingehend untersucht worden. Auf molekularer Ebene wurde die Bedeutung der DQ- $\beta$ -Kette, an deren Position 57 beim empfänglichen Haplotyp keine Asparaginsäure liegt (non-Asp 57-DQ- $\beta$ -Allel), und die Rolle des Arginins an Position 52 der DQ- $\alpha$ -Kette (Arg 52-DQ- $\alpha$ -Allel) festgestellt. Die genetische Assoziation eines solchen DQ8-Haplotyps mit dem Typ 1 Diabetes erklärt auch teilweise die Assoziation mit HLA-DR3 und HLA-DR4. Fünfundneunzig Prozent der Typ 1 Diabetes-Patienten sind aufgrund serologischer Bestimmungen HLA-DR3 oder -DR4 Haplotypen; die molekulare Grundlage dieser Assoziation besteht aber zumindest teilweise in einer genetischen Koppelung (*linkage disequilibrium*) mit dem Arg 52-DQ- $\alpha$ -Allel (für HLA-DR3) bzw. dem non-Asp 57-DQ- $\beta$ -Allel (für HLA-DR4) (FRIDAY et al., 1999).

Der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung wirken regulierende T-Zellen entgegen, die eine Subpopulation der  $CD4^+$  T-Zellen darstellen (FOWELL u. MASON, 1993; SAKAGUCHI, 2000; READ u. POWRIE, 2001). Möglicherweise kommt beim Zusammenbruch der regulatorischen Mechanismen auch jenen Viren eine besondere Rolle zu, die gemeinsame Epitope mit Autoantigenen besitzen und dadurch potentiell autoreaktive T Zellen aktivieren (CHOUDHURI u. VERGANI, 1998).

Bei bestehender genetischer Prädisposition können Lymphozyten selbst einen zerstörenden Autoimmunprozeß in Gang setzen; so sind  $CD4^+$  T-Zellen mit bestimmten transgenen TCR in der Lage, einen Diabetes hervorzurufen (KURRER et al., 1997). In NOD-Mäusen gelang dies auch durch den Transfer bestimmter  $CD4^+$  (PETERSON u. HASKINS, 1996) bzw.  $CD8^+$  T-Zell-Linien (WONG et al., 1996; GRASER et al., 2000). Ebenso gelingt es mit bestimmten

CD8<sup>+</sup> T-Zell-Linien auch in CD4-defizienten Mäusen einen Diabetes zu übertragen (MORA et al., 1999). Bei Transferexperimenten mit Lymphozyten aus NOD-Mäusen in NOD.scid-Mäusen, denen T- und B-Zellen fehlen, können dagegen sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> gemeinsam mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen den Diabetes übertragen (ABLAMUNITS et al., 1999). Für den Beginn der spontanen Insulitis der NOD-Maus sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen aber notwendig und diese scheinen in der Lage zu sein, in CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein gegen  $\beta$ -Zellen gerichtetes zerstörendes Potential zu entfachen (WANG et al., 1996). Demgegenüber sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Progression der Insulitis essentiell (MORA et al., 1999). Da  $\beta$ -Zellen selbst nicht MHC-Klasse II exprimieren, können CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur das präsentierte Autoantigen auf dendritischen Zellen oder Makrophagen erkennen. Eine direkte Wechselwirkung zwischen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der  $\beta$ -Zelle ist somit für die Zerstörung der  $\beta$ -Zelle und Entwicklung der Insulitis nicht notwendig (LO et al., 1993). Die Erkennung des Autoantigens aus den  $\beta$ -Zellen bzw. die Aktivierung spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen findet wahrscheinlich in den regionalen Lymphknoten statt (HÖGLUND et al., 1999). Die dendritischen Zellen haben zuvor lokal Autoantigen aufgenommen, um damit in die Lymphknoten zu wandern (LUDEWIG et al., 1999). Eine direkte zytotoxische Wechselwirkung mit  $\beta$ -Zellen kann von CD4<sup>+</sup> T-Zellen dennoch durch die Freisetzung  $\beta$ -Zell-toxischer Zytokine stattfinden. Ebenso können Fas-Ligand-exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Fas-vermittelte Mechanismen fähig sein,  $\beta$ -Zellen direkt zu zerstören. Auf  $\beta$ -Zellen steigt Fas-Expression unter dem Einfluß von IL-1 $\beta$  und NO (AMRANI et al., 2000; DE MARIA u. TESTI, 1998).

Die beim Typ 1 Diabetes auftretenden Autoantikörper sind für die Krankheitsauslösung hingegen nicht entscheidend. So rufen maternale Autoantikörper keine Diabeteserkrankung bei Neugeborenen hervor (HAMALAINEN et al., 2000). Autoantikörper gegen GAD65 können jedoch die Präsentation von GAD65 insofern modulieren, als dass ihre Gegenwart eine verstärkte T-Zell-Reaktion bewirkt (REIJONEN et al., 2000). T-Zellen können in Transferexperimenten ohne Anwesenheit von B-Zellen einen Diabetes hervorrufen (ABLAMUNITS et al., 1999), aber B-Zellen scheinen beim spontanen Diabetes der NOD-Maus für die Initiierung der Krankheit und insbesondere für die zelluläre Immunantwort gegen das Autoantigen GAD65 eine essentielle Bedeutung zu haben (FALCONE et al., 1998). Obwohl also in Diabetesmodellen den B-Zellen eine wichtige Rolle (KONDO et al., 2000; NOORCHASHM et al., 2000) durch ihre Funktion als antigenpräsentierende Zelle (ROTH et al., 1997) zugewiesen wird, spricht die jüngste Beschreibung eines Typ 1 Diabetikers mit

angeborener B-Lymphozyten-Defizienz jedoch gegen eine essentielle Beteiligung der B-Lymphozyten an der Entstehung des Typ 1 Diabetes (MARTIN et al., 2000).

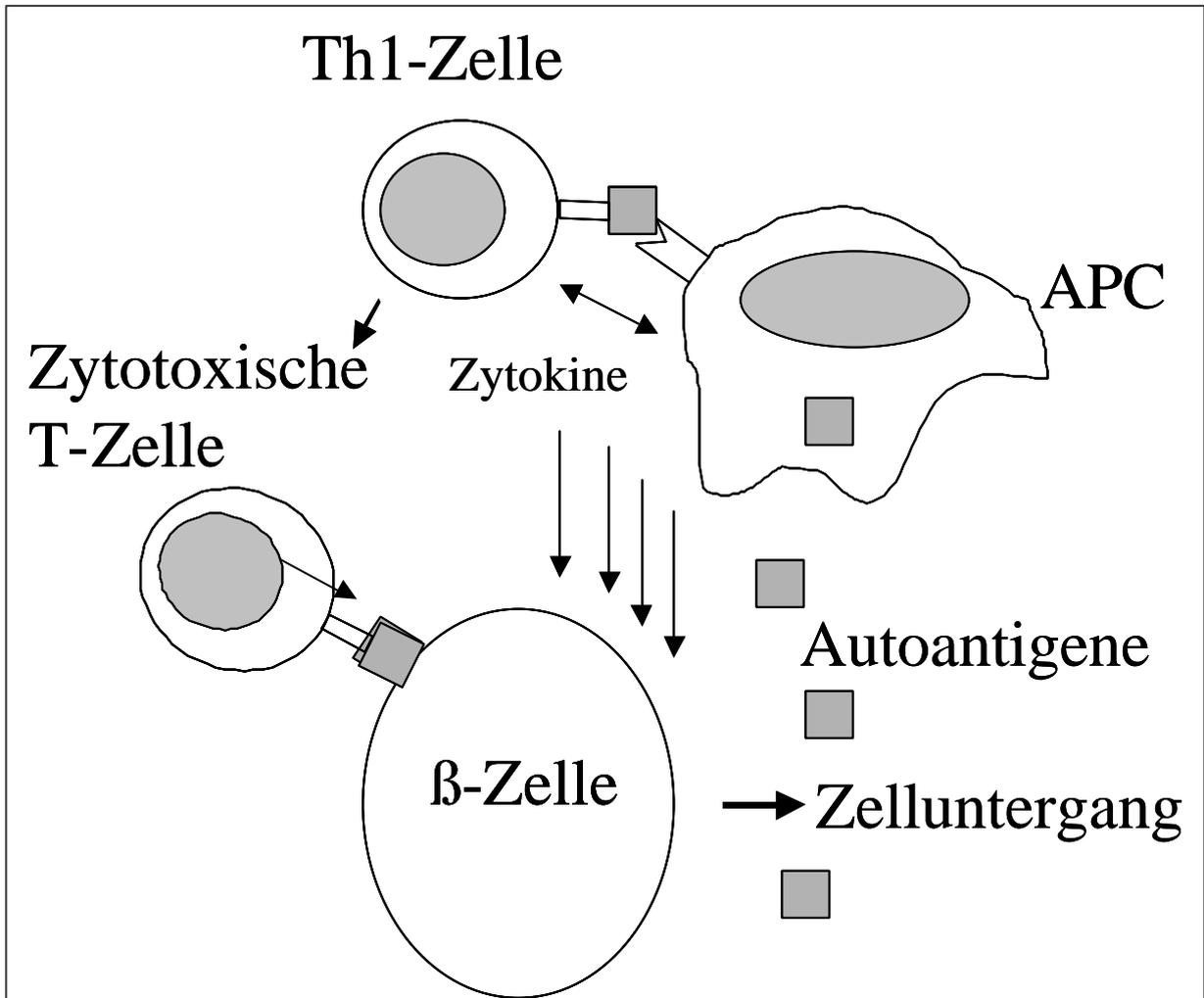


Abb. 1: Schematische Darstellung der Immunmechanismen, die zur  $\beta$ -Zell-Zerstörung beitragen

Nach einer  $\beta$ -Zell-Schädigung werden Autoantigene frei, die von APCs präsentiert werden. Diese aktivieren autoreaktive Th1-Zellen und wirken selbst durch Zytokinsekretion direkt  $\beta$ -Zell-schädigend. Th1-Zellen aktivieren autoreaktive zytotoxische T-Zellen und stimulieren die antigenpräsentierende Zelle. Spezifische zytotoxische T-Zellen erkennen auf der  $\beta$ -Zelle Autoantigen, wodurch weitere  $\beta$ -Zell-schädigende Effektormechanismen ausgelöst werden.

### 2.3. Anti-CD4-Ak-Therapie des Typ 1 Diabetes

Der Nachweis einer zentralen Rolle der T-Zellen beim Diabetes hat zur experimentellen Erprobung von Therapien mit monoklonalen Antikörpern (mAk) geführt, welche gegen T-Zell-Antigene gerichtet sind.

Mit einer anti-CD8-mAk-Behandlung gelingt es, sowohl den spontanen Diabetes der NOD-Maus als auch einen STZ-induzierten Diabetes zu unterdrücken (PARISH et al., 1998).

Mit anti-CD4-Ak-Behandlungen erzielte man in verschiedenen Diabetesmodellen ebenfalls therapeutische Effekte (SHIZURU u. FATHMAN, 1993). Antikörper gegen das CD4-Molekül können mit der funktionellen Wechselwirkung zwischen dem CD4-Korezeptor und dem MHC-Klasse II-Molekül interferieren und somit Aktivierung bzw. Stimulierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflussen. Dies erklärt die immunsuppressive Wirkung einer anti-CD4-Ak-Therapie. Die Mechanismen weiterer Effekte einer anti-CD4-Ak-Behandlung, wie zum Beispiel die Induktion spezifischer Toleranz, sind dagegen unbekannt (QIN et al., 1990). Die Wirkungsmechanismen gehen über eine Störung der Korezeptorfunktion hinaus. So können bei dem gegen das murine CD4-Molekül gerichteten mAk YTS177.9 modulierende Effekte an *in vitro* stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch dann beobachtet werden, wenn die Stimulierung unabhängig von der Funktion des CD4-Moleküls als Korezeptor geschieht (LI et al., 1999). Eine anti-CD4-mAk-Behandlung kann außerdem zu einer generellen Reduktion (Depletion) der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (FACCHINETTI et al., 1992) oder zur Reduktion einzelner CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen (Teildepletion) führen (HOWIE et al., 1994). Die genauen Zusammenhänge zwischen den Phänomenen Depletion, Anergie und der Induktion antigenspezifischer Toleranz mittels anti-CD4-Behandlung sind jedoch bislang nicht genügend dargelegt. In der Therapie des spontanen Diabetes der NOD-Maus wurden sowohl depletierende (SHIZURU et al., 1988; CHARLTON u. MANDEL, 1989) als auch nicht-depletierende (PARISH et al., 1998; PHILLIPS et al., 2000) anti-CD4-mAk eingesetzt. Die Bindung verschiedener anti-CD4-mAk an unterschiedliche Epitope des CD4-Moleküls ist eine Erklärung für bisher widersprüchliche Ergebnisse, die mit differenten mAk erzielt wurden, denn die Aktivierung bestimmter Signaltransduktionsschritte hängt stark von dem vom mAk erkannten Epitop am CD4-Molekül ab (BALDARI et al., 1995). Die Epitopspezifität der verwendeten mAk entscheidet somit höchstwahrscheinlich darüber, ob ein bestimmter mAk immuntherapeutische Mechanismen auslöst.

Weil die im normalen Versuchstier wirksamen mAk wegen fehlender Strukturhomologie des murinen CD4 zum humanen CD4-Molekül irrelevant für humane Therapien sind, konnte trotz erfolgreicher Anwendung von anti-CD4-Ak-Therapien in verschiedenen Tiermodellen bislang keine anti-CD4-Ak-Therapie am Menschen etabliert werden. Aus diesem Grund ist die Verwendung einer transgenen Maus mit humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie die CD4/DR17-Maus, ein vielversprechender Ansatz für vorklinische Studien über anti-CD4-Ak-Therapien (LAUB et al., 2000).

## 2.4. Tiermodelle des Typ 1 Diabetes

Tiermodelle dienen seit langem der Erforschung der krankheitsauslösenden Mechanismen beim Typ 1 Diabetes (WONG u. JANEWAY, 1999). Die Fortschritte der Gentechnik ermöglichen zunehmend den Einsatz von Tieren mit definierten Gendefekten oder mit Transgenen, wodurch deren pathogenetische Rolle erforscht werden kann (WONG et al., 1999). Eine besondere Bedeutung haben transgene Tiere gewonnen, die bestimmte menschliche Gene tragen. Mittels solcher humanisierter Tiermodelle sind Ergebnisse zu erwarten, die im Idealfall Aussagen über den Einfluß der zu untersuchenden Moleküle beim Diabetes des Menschen erlauben (TANEJA u. DAVID, 1999).

Der Diabetes mellitus im Tiermodell kann nach seiner Genese in zwei Kategorien eingeteilt werden, den spontanen und den induzierten Diabetes (KARGES et al., 1995).

Bei Mäuse- bzw. Rattenstämmen, die spontan einen Diabetes mellitus entwickeln, besteht eine genetische Veranlagung zur Ausbildung der Krankheit. Die Analyse solcher diabetesprädisponierender Gene liefert wertvolle Erkenntnisse zur Pathogenese der Erkrankung. Die am meisten verbreiteten Versuchstiermodelle sind hierbei die NOD-Maus (MAKINO et al., 1980) und die Wistar-BB-Ratte (NAKHOODA et al., 1977). Die NOD-Maus hat sich als wichtigstes Tiermodell durchgesetzt, weil dieser murine Diabetes dem Typ 1 Diabetes des Menschen sehr ähnelt. Die Gemeinsamkeiten betreffen homologe genetische Defekte sowie das Auftreten zellulärer Autoimmunität gegen die gleichen Autoantigene wie z. B. GAD65 (KAUFMAN et al., 1993), IA2 (MYERS et al., 1998) und Insulin (WEGMANN et al., 1994).

In Versuchstieren kann ein Diabetes bzw. eine Hyperglykämie weiterhin durch folgende experimentelle Manipulationen induziert werden:

- Immunisierung, z.B. mit einem bestimmten Peptid des 60kDa Hitzeschockproteins (ELIAS et al., 1995)
- Transfer von diabetogenen Zellen (YLINEN et al., 2000)
- Chirurgisches Entfernen des Pankreas
- Infizierung mit bestimmten Viren, wie dem Enzephalomyocarditis-Virus (BUSCHARD et al., 1983)
- Verabreichung diabetogener Pharmaka, wie den Nitrosamiden Streptozotolin (STZ) und Chlorozotolin oder dem Amin Alloxan. Mittels STZ wird in Maus und Ratte in zwei unterschiedlichen Dosierungsmodellen, dem Hoch-Dosis (HD)- und dem Mehrfach-Niedrigdosis (MLD)-STZ Modell, ein Diabetes induziert. Nur das MLD-STZ-Modell

weist eine  $\beta$ -Zell-Zerstörung unter Beteiligung von Immunmechanismen auf und gilt als ein Modell für den Typ 1 Diabetes (LIKE u. ROSSINI, 1976). [Anmerkung: wenn nicht besonders vermerkt, wird in dieser Arbeit der Begriff des STZ-Diabetes synonym mit dem Begriff MLD-STZ-Diabetes verwendet]

- Einschleusung von Transgenen; z.B. bestimmte transgene T-Zell-Rezeptoren (KATZ et al., 1993)

Wichtige experimentelle Erkenntnisse ergeben sich auch aus der Kombination verschiedener Ansätze. Dies ist z. B. bei der Beschleunigung oder Verhinderung des NOD-Maus-Diabetes durch transformierte Gene (SALOMON et al., 2000), durch Immunisierung (RAMIYA et al., 1997), Zelltransfer (BOITARD et al., 1989) oder Behandlung mit unterschiedlichen Pharmaka, wie Zyklophosphamid, welches den Diabetesverlauf der NOD-Maus beschleunigt (CHARLTON et al., 1989), der Fall.

## 2.5. Der Streptozotozin-induzierte Diabetes

Der MLD-STZ-Diabetes in der Maus ist das älteste tierexperimentelle Krankheitsmodell für den Typ 1 Diabetes. Gegenüber Tiermodellen des spontanen Diabetes hat es den Vorteil, dass es auf verschiedene Mausstämme angewendet werden kann, und ein Diabetes innerhalb eines engen Zeitfensters induziert wird.

STZ ist ein natürlich vorkommendes Antibiotikum, das von *Streptomyces achromogenes* produziert wird. Seine Struktur ist die eines Nitrosamid-Methyl-Nitroso-Harnstoffes, der an die C2-Position einer D-Glukose gebunden ist (HERR et al., 1967).

STZ wirkt *in vitro* zytotoxisch auf  $\beta$ -Zellen, wenn deren Insulinsekretion glukoseabhängig reguliert wird. Glukoseunabhängige Inselzelllinien sind dagegen resistent gegen STZ (LEDOUX u. WILSON, 1984). Die Glukose innerhalb des STZ-Moleküls vermittelt somit die  $\beta$ -Zell-Spezifität der toxischen Wirkung. SCHNEDL et al. (1994) zeigten eine direkte Beteiligung des Glukosetransporters 2 (GLUT-2), mit dessen Hilfe STZ aktiv in die  $\beta$ -Zellen gelangt.

Die zytotoxische Aktivität von STZ beruht auf der Wirkung seines Nitrosamidanteils, dessen Spaltprodukte Schäden an der Desoxyribonukleinsäure (DNS) hervorrufen (WILSON u. LEITER, 1990). Im Rahmen des Reparaturprozesses kommt es zur Aktivierung des Enzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Das Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) dient hierbei als Cosubstrat für PARP (YAMAMOTO et al., 1981). Die gesteigerte Aktivität des Enzyms und der daraus resultierende NAD-Mangel sind letztlich für den Inselzelluntergang verantwortlich. Eine Verabreichung von Nikotinamid (NA) hemmt den toxischen Effekt von STZ, indem es die Aktivität von PARP inhibiert. Mäuse, denen das Enzym PARP fehlt, und die von diesen abstammenden Inselzellen sind daher gegenüber den zytotoxischen Effekten von STZ resistent (BURKART et al., 1999). Die erhöhte PARP-Aktivität als Ursache für den  $\beta$ -Zell-Tod ist möglicherweise von modellübergreifender Bedeutung für das Verständnis des  $\beta$ -Zell-Unterganges beim Diabetes, denn sowohl der spontane (YAMADA et al., 1982) als auch der mit Zyklophosphamid beschleunigte Diabetes der NOD-Maus können durch NA-Gabe gehemmt werden (O'BRIEN et al., 2000). Daher wird gegenwärtig u. a. im Rahmen des *European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial* klinisch getestet, ob die Applikation von NA auch beim Menschen das Risiko senkt, an Diabetes zu erkranken (GALE u. BINGLEY, 1994). Die bisherigen Ergebnisse weisen allerdings auf keinen vorbeugenden Effekt bei Patienten mit besonders hohem Diabetesrisiko (LAMPETER et al., 1998).

LIKE und ROSSINI (1976) zeigten den verzögerten Ausbruch eines Diabetes nach der Verabreichung von mehreren niedrigen, nicht diabetogenen Dosen von Streptozotocin. Hierbei treten Infiltrate in Langerhans'schen Inseln auf, wie sie beim humanen Typ 1 Diabetes bekannt sind. Die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch eine hohe STZ-Einzeldosis ruft im Gegensatz dazu keine Insulitis hervor (LIKE u. ROSSINI, 1976).

Obwohl beim MLD-STZ-Modell jeweils subdiabetogene Einzeldosen eingesetzt werden, verursacht deren kumulative Wirkung auch eine direkte Zerstörung der  $\beta$ -Zellen (BONNEVIE-NIELSEN et al., 1981). Nach der STZ-Behandlung treten in  $\beta$ -Zellen weiterhin funktionelle Störungen auf, wie zum Beispiel eine reduzierte GLUT-2-Synthese. Dieser Vorgang geht der Insulitis voran (REDDY et al., 1998) und kann ebenso an isolierten Inselzellen beobachtet werden (WANG u. GLEICHMANN, 1995).

Die beim MLD-STZ auftretende Insulitis bleibt in syngenem Inseln aus, die in MLD-STZ-diabetische Mäuse implantiert werden (ANDERSSON, 1979). Demgegenüber treten in der NOD-Maus nach syngenem Inseltransplantationen (STEGALL et al., 1996 a) und beim Typ 1 Diabetiker nach allogenen Transplantationen Autoimmunreaktionen auf (STEGALL et al., 1996 b), die auf T-Zellen zurückgeführt werden, welche spezifisch gegen  $\beta$ -Zell-Autoantigene reagieren. Bei MLD-STZ-behandelten Tieren treten Insulitiden in syngenem Spenderinseln jedoch nur dann auf, wenn die Spenderinseln vorher mit STZ behandelt wurden (WEIDE u. LACY, 1991). Mittels STZ-vorbehandelten Inseln, die vor der MLD-STZ-Behandlung in den Thymus transplantiert werden, kann auch die Entwicklung eines MLD-STZ-Diabetes verhindert werden. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der Induktion einer thymusvermittelten Toleranz (HEROLD et al., 1997). Die Befunde unterstützen die Vermutung, dass durch die Wirkung des STZ Neoantigene auf den  $\beta$ -Zellen gebildet werden (WILSON u. LEITER, 1990). Eine Immunisierung mit STZ induziert eine spezifisch gegen STZ gerichtete T-Zell-Antwort, die für die Insulitis beim MLD-STZ-Diabetes von Bedeutung sein könnte. Die  $\beta$ -Zellen werden hierbei möglicherweise vom STZ haptenartig markiert und dann von T-Zellen als „fremd“ erkannt (KLINKHAMMER et al., 1988). In neueren Experimenten stellte sich heraus, dass bei dieser STZ-spezifischen Lymphozytenreaktion  $CD8^+$  T-Zellen aktiviert werden (CHOQUET-KASTYLEVSKY et al., 2000).

Die Tatsache, dass sich die MLD-STZ-Behandlung auf Mäuse unterschiedlicher Stämme verschiedenartig auswirkt, ist eine mögliche Erklärung für kontroverse Aussagen über die Bedeutung von Immunzellen für den MLD-STZ-Diabetes. Nicht alle Mausstämme entwickeln unter MLD-STZ-Behandlung eine Insulitis und deren Fehlen schließt die Entwicklung einer

Hyperglykämie nicht aus (REDDY et al., 1995). Auch unterscheiden sich Krankheitsschwere und Grad der Insulinitis zwischen unterschiedlichen Mausstämmen (WOLF et al., 1984; HEROLD et al., 1997). Solche Differenzen zeigten sich ebenfalls gegenüber der toxischen Wirkung von STZ *in vitro* (CARDINAL et al., 1998) sowie *in vivo* gegenüber hohen STZ-Dosen (ROSSINI et al., 1977 b). Jedoch konnte durch Vergleiche verschiedener Mausstämme ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung einer Hyperglykämie und einer Insulinitis nach der MLD-STZ-Behandlung sowie der Produktion von den inflammatorischen Zytokinen IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  demonstriert werden (HEROLD et al., 1997; LUKIC et al., 1998; MÜLLER u. GLEICHMANN, 2000). Diese Zytokine treten in den Insulinitiden vor dem Auftreten der ersten histologisch detektierbaren Läsionen auf. Von diesen spielt besonders IFN- $\gamma$  eine pathogenetische Rolle. Es ist verantwortlich für die verstärkte Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf den Inselzellen, die nach MLD-STZ-Behandlung zu beobachten ist (COCKFIELD et al., 1989), und eine IFN- $\gamma$ -Applikation verstärkt die auftretende  $\beta$ -Zell-Schädigung (CAMPBELL et al., 1988) T-Zell-abhängig (VALLERA et al., 1992). Eine anti-IFN- $\gamma$ -Ak-Behandlung unterdrückt den MLD-STZ-Diabetes (HEROLD et al., 1996).

An der Insulinitis im MLD-STZ-Diabetes sind Makrophagen, T- und B-Zellen beteiligt (IWAKIRI et al., 1990). Die ersten Entzündungszellen im Inselgebiet sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Makrophagen sind an der Initiierung einer zytotoxischen MHC-unabhängigen Antwort beteiligt (IHM et al., 1990; KANTWERK-FUNKE et al., 1991) und eine Vorbehandlung mit Silika, einem spezifischen Makrophagengift, verhindert einen MLD-STZ-Diabetes (OSCHILEWSKI et al., 1986). Die Makrophagen sezernieren Entzündungsmediatoren, die entweder selbst toxisch auf  $\beta$ -Zellen wirken oder die Bildung anderer toxischer Mediatoren induzieren. Der Ausbruch eines MLD-STZ-Diabetes kann folglich durch Therapien, die solche Mediatoren als Zielstruktur haben, unterbunden werden. Zum Beispiel kann mit einem IL-1-Rezeptor-Antagonist der MLD-STZ-Diabetes aufgehalten werden (SANDBERG et al., 1994). Ebenso kann die spezifische Hemmung von Zyklooxygenase 2 (COX-2) die Hyperglykämie im MLD-, aber nicht im HD-STZ-Diabetes verhindern (TABATABAIE et al., 2000). COX-2 ist ein Enzym der Prostaglandinsynthese und wird im Gewebe durch proinflammatorische Zytokine induziert. Es unterliegt einem gemeinsamen Regelkreis mit der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS). An isolierten Inseln wurde gezeigt, dass in diesen NO und das Prostaglandin E<sub>2</sub> produziert wird. Die zytokininduzierte Überproduktion von NO durch iNOS wird als einer der pathogenetischen

Mechanismen der  $\beta$ -Zell-Zerstörung beim MLD-STZ-Diabetes angesehen (HALUZIK u. NEDVIDKOVA, 2000). Daher besteht in iNOS-defizienten Mäusen eine verringerte Anfälligkeit gegenüber dem MLD-STZ-Diabetes (FLODSTROM et al., 1999).

Eine T-Zell-abhängige, antigenspezifische Immunantwort gegen  $\beta$ -Zellen wird beim menschlichen Typ 1 Diabetes als wichtiger Mechanismus der Pathogenese der Erkrankung angesehen. Im MLD-STZ-Diabetes-Modell fanden daher Untersuchungen mit Mäusen ohne T-Zellen statt. Diese Studien mit thymuslosen Mäusen ergaben widersprüchliche Ergebnisse, die zum Teil auf die unterschiedlichen Mausstämme bzw. die Heterogenität unterschiedlicher BALB/c-Kolonien zurückgeführt werden konnten. Der MLD-STZ-Diabetes ist aber in solchen Mausstämmen T-Zell-abhängig, bei denen eine Insulitis Teil der MLD-STZ-Diabetes-Pathogenese ist (NAKAMURA et al., 1984). Ebenso wenig entwickelt sich in thymektomierten und anti-CD4- und anti-CD8-behandelten Mäusen ein MLD-STZ-Diabetes (HEROLD et al., 1987). Mittels der Übertragung von T-Zellen kann eine Unempfindlichkeit von athymischen (PAIK et al., 1980) bzw. bestrahlten Mäusen (PAIK et al., 1982 b) gegenüber einer MLD-STZ-Diabetes-Induktion aufgehoben werden. Beim murinen MLD-STZ-Diabetes liegt aber im Gegensatz zu anderen Modellen keine T-Zell-Antwort gegen bekannte Insel-Autoantigene vor. Das Auftreten von Inselzell-Autoantikörpern am Ende der dritten Woche nach Beginn der STZ-Behandlung beschreibt BÜYÜKDEVİRİM (1994). Weiterhin werden Autoantikörper gegen Insulin und hsp60 (ELIAS et al., 1994) sowie gegen Zellkernbestandteile gebildet (HUANG u. TAYLOR, 1981). Ein Effektormechanismus, über den T-Zellen antigenunabhängig zur STZ-Diabetes-Pathogenese beitragen, besteht möglicherweise in der Stimulierung der Makrophagen (DAYER-METROZ et al., 1988).

Resultate aus Experimenten, bei welchen mittels des adoptiven Transfers von Milzzellen MLD-STZ-behandelter Mäuse eine Hyperglykämie (BUSCHARD u. RYGAARD, 1977) bzw. eine transiente Hyperglykämie (PAIK et al., 1980) nach einer STZ-Vorbehandlung des Empfängertiers (KIM u. STEINBERG, 1984) übertragen wurde, konnten durch andere Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (BEATTIE et al., 1980; KLINKHAMMER et al., 1988). KIESEL et al. (1980) beschreibt aber den erfolgreichen Transfer einer Insulitis, die nicht zum Ausbruch eines Diabetes führt. Dies gelang nur bei thymuslosen Empfängermäusen bestimmter Mausstämme (KIESEL et al., 1981a). In einer anderen Studie war für die Übertragung der Insulitis eine STZ-Vorbehandlung der Empfängertiere notwendig. Durch diese findet eine Einwanderung von Makrophagen statt, die über die Regulierung von

Adhäsionsmolekülen eine Ansammlung der übertragenen Lymphozyten in den Inseln hervorrufen (KUSTERER et al., 1999).

Es ist schwierig, die komplexe  $\beta$ -Zell-Zytotoxizität des STZ von der Immunpathogenese des MLD-STZ-Diabetes abzugrenzen; auch in Anbetracht der Tatsache, dass das STZ Immunzellen im Knochenmark funktionell schädigen kann und somit an sich immunmodulierend wirkt (NICHOLS et al., 1981). Die diabetogene Wirkung von STZ läßt sich aber mit dem Antagonisten 3-O-Methylglukose mildern, ohne die Insulitis zu verhindern, wohingegen eine Depletion der T-Lymphozyten den Ausbruch des Diabetes während der Behandlungsdauer und die Bildung einer Insulitis aufhalten konnte. Erst die kombinierte Therapie beider Ansätze unterdrückte in diesen Experimenten vollständig die Wirkungen der MLD-STZ-Behandlung (ROSSINI et al., 1978). Weiterhin wurde mit der Verabreichung von gegen Oberflächenantigene der T-Zellen gerichteten Antikörpern vor der STZ-Behandlung der MLD-STZ-Diabetes verzögert. Dies gelang mit anti-CD3- (HEROLD et al., 1992; VALLERA et al., 1992) oder anti-CD8- und anti-CD4-mAk ebenso wie mit der Gabe von anti-CD4-mAk allein (KANTWERK et al., 1987; DAYER-METROZ et al., 1988).

Eine Depletion von B-Zellen hat dagegen keinen Einfluß auf den MLD-STZ-Diabetes-Verlauf (BLUE u. SHIN, 1984). In einem murinen B-Zell-knockout-Mausmodell konnte jedoch demonstriert werden, dass ihnen beim MLD-STZ-Diabetes dennoch eine Bedeutung als antigenpräsentierende Zelle zukommt (KONDO et al., 2000).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass beim MLD-STZ-Modell  $\beta$ -Zell-toxische Effekte des STZ und der sich ansammelnden Entzündungszellen (Makrophagen und T-Lymphozyten) einen insulinabhängigen Diabetes hervorrufen. Die Untersuchungen der Mechanismen dieses induzierten Diabetes tragen zu grundlegenden Erkenntnissen über den menschlichen Typ 1 Diabetes bei. Der genaue Pathogenesemechanismus ist aber auch beim MLD-STZ-Diabetes nicht vollständig geklärt (PAPACCIO et al., 2000).

## Tiere, Material und Methoden

### 3.1. Das CD4/DR17-transgene Mausmodell

#### 3.1.1. Beschreibung des CD4/DR17-transgenen Mausmodells

Transgene Tiere, die humane Moleküle exprimieren, eignen sich zur Erprobung von Interventionen, die auf diese Moleküle zielen (siehe 2.3.). Die in dieser Arbeit verwendete mehrfach-transgene Mauslinie (CD4/DR17-Maus) repräsentiert ein partiell humanisiertes Immunsystem. Sie trägt die Gene für zwei wichtige Moleküle des menschlichen Immunsystems.

Sie exprimiert erstens das menschliche Histokompatibilitätsantigen DR17, eine Splitvariante des DR3, welches auf den Genen für die  $\alpha$ -Kette DRA 1 und für die  $\beta$ -Kette DRB 03011 beruht. Zweitens trägt sie das Gen für den menschlichen CD4-Korezeptor. Drittens ist das murine CD4-Molekül auf DNS-Ebene inaktiviert worden (*CD4-knockout*) (LAUB et al., 1998). Damit stellt die CD4/DR17-Maus ein fortschrittliches humanisiertes Tiermodell zur Erforschung der Wechselwirkung des CD4- und des MHC-Klasse II- Moleküls dar. Erst die Exprimierung sowohl eines humanen MHC-Klasse II- als auch eines humanen CD4-Moleküles ermöglicht die optimale Verbindung beider zur CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Aktivierung notwendigen Moleküle, da ein murines MHC-Klasse II-Molekül weniger gut mit dem humanen CD4-Molekül interagieren kann, wenngleich eine solche funktionelle Wechselwirkung vorkommt (VIGNALI et al., 1992). LAUB et al. (2002) konnten zeigen, dass die menschlichen transgenen Moleküle der CD4/DR17-Maus tatsächlich in die Induktion von Immunantworten eingebunden sind.

Die CD4/DR17-Maus ist das Produkt sukzessiver Kreuzungen verschiedener transgener Mausstämme (LAUB et al., 2000): Die *CD4-knockout* Mauslinie (CD4<sup>-</sup>) wurde mit der hCD4-transgenen Maus (KILLEEN et al., 1993) und deren Kreuzungsprodukt mit der HLA-DR17<sup>+</sup>-transgenen Maus (DR17<sup>+</sup>) (STRAUSS et al., 1994) gepaart. Die Maus-MHC-Haplotypen (H2) waren in Tieren der Generation F8 nicht einheitlich. So sind die Tiere heterozygot bezüglich der Haplotypen H2-K<b>, H2-K<q>, H2-K<s>, H2-D<b> (Auskunft von Martina Dorsch, Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover). Die verschiedenen H2-Haplotypen basieren auf den bei der Zucht der CD4/DR17-Maus verwendeten Mausstämmen. Die Mauslinie, die humanes CD4 auf einem murinem *CD4-knockout*-Hintergrund exprimiert, trägt die H2-Haplotypen (in Klammern) der 4 Herkunftsstämme: SJL (H2-K<s>, H2-D<s>), 129/Sv (H2-k<b>, H2-D<b>), C57BL/6J

(H2-K<sup>b</sup>, H2-D<sup>b</sup>) und DBA/2J (H2-H<sup>d</sup>, H2-D<sup>d</sup>). Der HLA-DR17-tragende Kreuzungspartner basiert auf dem Stamm B10Q (H2-K<sup>q</sup>, H2-D<sup>q</sup>).

Die Verpaarung der mehrfach-transgenen CD4/DR17-Mäuse führte noch in der 8. Inzuchtgeneration zum Auftreten von Segreganten, denen eines oder zwei der transgenen Merkmale fehlten. So traten CD4-*knockout*-Mäuse mit bzw. ohne DR17-Expression auf. Ebenso gab es Mäuse mit hCD4 in einem mur CD4-defizientem Hintergrund, denen jedoch eine DR17-Expression fehlte.

Die Segreganten dienten dazu, die Rolle der exprimierten bzw. nicht exprimierten transgenen Moleküle im MLD-STZ-Modell zu untersuchen.

### ***3.1.2. Eingesetzte transgene Tiere***

Meinen Untersuchungen standen Mäuse mit folgenden vorhandenen (†) bzw. fehlenden (°) Merkmalen oder Transgenen zur Verfügung:

hCD4<sup>+</sup>/murCD4<sup>-</sup>/DR17<sup>+</sup> (CD4/DR17),

hCD4<sup>-</sup>/murCD4<sup>-</sup>/DR17<sup>+</sup> (CD4<sup>-</sup>/DR17),

hCD4<sup>+</sup>/murCD4<sup>-</sup>/DR17<sup>-</sup> (hCD4)

hCD4<sup>-</sup>/murCD4<sup>-</sup>/DR17<sup>-</sup> (CD4<sup>-</sup>)

Die Mäuse wurden im Tierstall des Institutes für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover gezüchtet. In den Versuchen wurden 2-15 Monate alte männliche Mäuse der 5.-8. Inzuchtgeneration benutzt. Es wurden Männchen gewählt, da geschlechtsspezifische Suszeptibilitätsunterschiede gegenüber STZ bestehen: Männliche Mäuse sind aufgrund eines höheren Androgen- und niedrigeren Östrogenspiegels empfänglicher als weibliche Mäuse (PAIK et al., 1982 a). Die Tiere aus einem Wurf blieben in einem Käfig untergebracht und wurden jeweils unterschiedlichen Behandlungsgruppen des jeweiligen Versuches zugeteilt.

Die Tiere wurden konventionell in Standardkäfigen zu Gruppen à 4-6 Tieren gehalten. Die Käfige waren in einem Filterschrank untergebracht, der einen gleichmäßigen 12-Stunden-Lichtzyklus gewährleistete.

### ***Hinweis zur Genehmigungspflicht der durchgeführten Tierversuche***

Die dargestellten Tierversuche sind genehmigungspflichtig im Sinne des Tierschutzgesetzes § 8 Absatz 1. Sie wurden im Rahmen des vom Regierungspräsidium Leipzig genehmigten Tierversuchsvorhabens Aktenzeichen 75-9185.81-1/96 durchgeführt.

### 3.2. Materialien

#### 3.2.1. Chemikalien, Medien und Medienzusätze

Äther (Diethylether)	Merck
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	SIGMA
Ampicillin	Gibco
Azeton	Merck
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Serva
DAB-Färbetabletten	SIGMA
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	SIGMA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
D-Glukose	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
EDTA-Na-Salz (Titrplex® III)	Merck
Eisessig	SIGMA
Entellan	Merck
Eosin	Serva
Ethanol (EtOH)	Merck
FACS-Lysepuffer	Becton Dickinson
Formaldehydlösung	Merck
Glyceringelatine, <i>Kaiser`s</i>	Merck
Hämalaunlösung, <i>Mayers</i>	Merck
Heparin	Seromed
Kälberserum, fötales (FKS)	Gibco
Kaliumbicarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	SIGMA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Levamisol	SIGMA
Methanol	Merck
Naphtol-As-Bi-Phosphat	SIGMA
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck

Natriumnitrit	Merck
Natriumpyruvat	Gibco
Natronlauge (NaOH)	Merck
Neufuchsin	Merck
Non-essential aminoacids 100x	Gibco
N,N-Dimethylformamid	Merck
Penicillin	Gibco
Pikrinsäure	SIGMA
Propandiol	SIGMA
RPMI 1640-Glutamax	Gibco
Salzsäure (HCl)	Merck
Streptavidin-Biotin-Komplex, Peroxidase konjugiert	DAKO
Streptomycin	Gibco
Streptozotolin	SIGMA
Tri-Natriumzitat-Dihydrat	Merck
Tris-Base (THAM)	Roth
Trizma-Hydrochlorid	SIGMA
Trypanblau	Merck
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck
Xylolersatz, <i>Rotithistol</i>	Roth
Zitronensäure	Merck

**Tabelle 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien, Medien und Medienzusätze und deren Bezugsquellen**

Zusammensetzung des Zellkulturmediums RPMI10:

RPMI1640-Glutamax + Natriumpyruvat [1 mM] + nicht-essentielle Aminosäuren 100x [10 ml/l], Ampicillin [25 mg/l], Penicillin [120 mg/l], Streptomycin [270 mg/l] und 10 % FKS.

### 3.2.2. Verbrauchsmaterialien

Blutglukosemessstreifen Accu-Trend	Boehringer Ingelheim
Cell-strainer	Falcon
Deckgläser 24x50 mm	Roth
Dialyseschlauch	Roth

Einmal-Steril-Filter 0,45 µm	Schleicher&Schuell FP 03012
Hämatokritröhrchen	
HiTrap Protein-G –Säule	Amersham
Injektionsspritze 1 ml	Becton-Dickinson
Injektionsspritze 10 ml	Braun
Knopfkanüle	
Objektträger <i>Superfrost</i>	Roth
Objektträger <i>Superfrost/Plus</i>	Roth
Tissue Tek, O.C.T. Compound	Digitana Laborbedarf AG
Tubes, Pipettenspitzen, Combitip	Eppendorf
Zellkulturgefäß, <i>miniPerm</i>	Heraeus-Instruments

**Tabelle 2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen**

### 3.2.3. Geräte

Blutglukosemeßgerät Accu-Trend Sensor	Boehringer Ingelheim
FACScan	Becton-Dickinson
Kryostat CM 3050	Leica
Mikrotom	Leica
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech
Waage 770	Kern
Zentrifuge 48S	ROTINA
Elektrophorese Apparatur	Pharmacia Biotech
Mikroskop mit digitalem Auswertungsgerät	Leica

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Gerätschaften und deren Bezugsquellen**

3.2.4. Antikörper

<b>Antikörper, die bei der immunhistologischen Färbung verwendet wurden</b>					
Antigen	Klon	Spezies/ Immunglobulin (Ig) -Klasse	Koppelung	Herkunft	Eingesetzte Verdünnung bzw. Konzentration
Schweine- Insulin	polyklonal	Meerschwein	unmarkiert	DAKO N1542	unverdünt
Meerschwein IgG	polyklonal	Esel	Alkalische Phosphatase (AP)	Dianova 706.055.148	1:250
hCD4	EDU-2	Maus	biotinyliert	Biosource AH 50419	1:20
<b>Antikörper, die bei der durchflußzytometrischen Analyse verwendet wurden</b>					
Antigen	Klon	Spezies/ Ig-Klasse	Fluoreszenz- Farbstoff	Herkunft	Eingesetzte Konzentration/ FACS-Röhrchen bzw. Probe in jeweils 25µl FACS-PBS
mur CD3	145.2G11	Hamster IgG	R-PE	Pharmingen 01515A	20 µg/ml
mur CD4	CT-CD4	Ratte IgG2a	FITC	CALTAG RM2501	20 µg/ml
hCD4	MT 310	Maus IgG1	PE-Cy5	DAKO C7069	20 µg/ml
mur CD8	53-5.8	Ratte IgG1	FITC	Pharmingen 01054D	10 µg/ml
mur CD25	PC 61	Ratte IgG1	R-PE	Pharmingen 553866	4 µg/ml
mur CD69	H1.2F3	Armenischer Hamster IgG	R-PE	Pharmingen 553237	2 µg/ml
mur CD71	C2F2	Ratte IgG1	R-PE	Pharmingen 553267	0,4 µg/ml
mur CD16/32	2.4.G2	Ratte IgG2b	unmarkiert	Pharmingen 553140	40 µg/ml
<b>Antikörper, die zur <i>in vivo</i>-Behandlung der Mäuse verwendet wurden</b>					
Antigen	Klon	Spezies/ Ig-Klasse	Herkunft		
hCD4	MAX 16H5	Maus IgG1	IKIT-Leipzig		
hCD4	MAX 12F6	Maus IgG2a	IKIT-Leipzig		
mur CD8	53.6.72	Ratte	IKIT-Leipzig		
Unbekannt	MOPC 21	Maus IgG1	Pharmingen		

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper und deren Bezugsquellen**

### 3.2.5. Rezepturen

#### *Puffer für die Affinitätschromatographie mit Protein G*

Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl) mit pH 9

Tris HCl 157,6 g  
aqua dest 1 l

*Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl; 0,075 M NaCl) mit pH 2,7*

Glycin-HCl 11,5 g  
NaCl 4,383 g  
aqua dest 1 l

*Äquilibrierpuffer (0,02 M Na-Phosphat) mit pH 7,0*

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 1,132 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 2,1 g  
aqua dest 1 l

#### *Phosphatpuffer (PBS)*

Zehnfach konzentrierte Stammlösung (0,15 M):

NaCl 200 g  
KCl 5 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 28,75 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g

Chemikalien in 2,5 l Volumen in Wasser auflösen, pH 7,4 einstellen, filtrieren und abfüllen.

Zum Herstellen der Gebrauchslösung werden 50 ml Stammlösung mit 450 ml *aqua dest* verdünnt.

#### *Tris-HCl-Puffer (TBS)*

Stammlösung:

Tris-Base 30,29 g  
0,1 N HCl 2125 ml  
Na Cl 37,5 g

Mit *aqua dest* wird auf 4,5 l aufgefüllt, auf pH 7,5 eingestellt und auf 5 l aufgefüllt.

Zur Herstellen der Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:10 mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt.

#### *FACS-Puffer*

Zu 500 ml PBS-Gebrauchslösung werden 5 ml FKS und 0,5 g Natriumazid gegeben.

*Erythrozyten-Lyse-Puffer*

NH<sub>4</sub>Cl 8,29 g (0,155 mol)  
KHCO<sub>3</sub> 1 g (0,01 mol)  
EDTA-Na-Salz (Titrplex® III) 3,72 mg (0,01 mmol)

Einen Liter aqua dest. hinzufügen und pH-Wert auf 7,3 einstellen (mittels NaOH bzw. HCl), dann steril filtrieren oder autoklavieren.

*Zitrat-Puffer*

Rezept für eine zehnfache Stammlösung (0,1M):

Lösung A:

Wasserfreie Zitronensäure 9,605 g in 500 ml *aqua dest*

Lösung B:

Tri-Natriumzitrat-Dihydrat 14,705 g in 500 ml *aqua dest*

Mit 63 ml der Lösung A werden 37 ml der Lösung B gemischt. Der pH 4,2 wird kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt, danach wird die Lösung filtriert. Die Lösungen A und B sind im Kühlschrank lagerfähig, die Stammlösung wurde aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. Gebrauchslösung: 5 ml Stammlösung ist mit 45 ml *aqua dest* zu verdünnen.

*Bouin-Fixations-Lösung*

Herstellen der gesättigten Pikrinsäurelösung:

Pikrinsäure 30 g  
heißes *aqua dest* 1000 ml

Lösung vor der weiteren Verwendung erkalten lassen (dabei bildet sich Niederschlag).

Ansatz der Bouin-Lösung:

gesättigte Pikrinsäurelösung 15 ml  
37%iges Formalin 5 ml  
Eisessig 1 ml

*Trypanblau-Vitalfärbelösung*

Trypanblau 0,1 g  
PBS 100 ml

*Neu-Fuchsin-Färbelösung zur Farbstoff-Entwicklung mit Hilfe der alkalischen Phosphatase*

Ansatz für 250 ml, Lösung 1:

NaCl 8,7 g  
Tris-HCl 1,5 g  
Tris-Base 4,9 g  
*aqua dest* 175 ml

Propandiol-Lösung:

Propandiol 21 g  
*aqua dest* 1000 ml

In Lösung 1 kommen 62,5 ml Propandiol-Lösung, der pH wird auf pH 9-9,8 eingestellt und 100 mg Levamisol werden hinzugegeben.

Na-Nitrit-Lösung:

Na-Nitrit 50 mg  
*aqua dest* 1250 µl

Nun wird in das gelöste Na-Nitrit 500 µl Neufuchsin und nach 1 min Reaktionszeit diese Mischung in die Lösung gegeben.

Neufuchsinlösung:

Neufuchsin 5 g  
2 nHCl 100 ml

Schließlich kommt gelöstes Naphto~~l~~-As-Bi-Phosphat dazu.

Naphto~~l~~-As-Bi-Phosphat –Lösung:

Naphto~~l~~-As-Bi-Phosphat 125 mg  
DMF 1500 µl

Der pH-Wert der Färbelösung wird auf pH 8,8 eingestellt und die Lösung vor Gebrauch filtriert.

### **3.3. Methoden**

#### **3.3.1. STZ-Behandlung**

Bei der MLD-STZ-Behandlung erhalten die Mäuse an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils eine intraperitoneale STZ-Applikation. An jedem der fünf Applikationstage werden die Mäuse zuvor gewogen und mit dem jeweils aktuellen Gewicht wird die zu verabreichende STZ-Dosis errechnet. Aufgrund der schnellen Zerfallszeit des gelösten STZ (LEE et al., 1993) finden die Injektionen innerhalb von 10 min nach dem Auflösen des STZ statt.

Das STZ ist auf einer Feinwaage in Portionen à 30-50 mg aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert worden. Kurz vor der Applikation wird ein Aliquot STZ in der Endkonzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  in Zitratpuffer (3.2.5) gelöst.

#### **3.3.2. Blutglukosebestimmung**

##### *Tägliche Blutglukosemessung*

Der individuelle Blutglukosewert (BG) jeder Maus ist bei allen Versuchen in zwischen 9 und 10.30 Uhr morgens bestimmt worden.

Zur Messung der Blutglukose mittels eines *Accu-Trend-Sensor* Meßgerätes, wird den Mäusen ein Stück Haut der Schwanzspitze angeritzt und der heraustretende Blutstropfen mit dem *Accu-Trend* Blutglukose-Meßstreifen im nach Herstellervorschrift justierten Blutglukosegerät aufgenommen. Der Blutglukosewert kann innerhalb einer Minute abgelesen werden.

##### *Der Orale Glukose-Toleranz-Test (OGTT)*

Beim OGTT wird die individuelle Fähigkeit des Organismus getestet, nach einer oralen Aufnahme von Glukose die Blutglukosehomöostase aufrechtzuerhalten. Der Test setzt sich aus Messungen der Blutglukose zu definierten Zeitpunkten nach der oralen Gabe von Glukose zusammen.

Dazu wird den Tieren achtzehn Stunden vor dem Glukosetoleranztest das Futter entzogen. Vor Verabreichung der Glukoselösung wird der Nüchtern-Blutglukosewert bestimmt. Jedem Tier wird nun ca. 50 mg Glukose eingegeben (Nach: CALCINARO et al., 1997): Eine Maus bekommt 120  $\mu\text{l}$  aus einer Glukoselösung (2,5 g in 6 ml Leitungswasser) mittels einer 1 ml Spritze und einer Knopfkanüle verabreicht. Hierbei ist es nicht nötig, besonderen Zwang auszuüben. Das Träufeln der Zuckerlösung auf die Zunge löst ein Trinkverhalten bei der in der Hand fixierten Maus aus. Nach exakt 15, 30, 45 und 60 Minuten wird die Blutglukose gemessen (siehe ‚Tägliche Blutglukosemessung‘).

Um unterschiedliche Tests eines Tieres vergleichen zu können, ist darauf geachtet worden, dass das einzelne Tier in unterschiedlichen OGTTs die jeweils gleiche Menge an Zuckerlösung erhält. Bestimmte Tiere haben die gesamte Menge von 120 µl nicht eingenommen. In diesen Fällen wurde die tatsächlich getrunkene Menge notiert und diesem Tier beim nächsten OGTT nur jeweils diese Menge verabreicht.

### ***3.3.3. Tötung der Maus und Organentnahme***

Die Maus wird in einer CO<sub>2</sub>-Kammer betäubt, die Bauchdecke mit Alkohol befeuchtet und die Felldecke der Bauchseite entfernt. Nach dem Öffnen der Brusthöhle wird mit einem Scherenschlag die Herzspitze abgeschnitten und das in die Brusthöhle fließende Blut mit einer 1 ml Spritze aufgesogen. Hiernach wird die Bauchhöhle eröffnet und Milz und Pankreas werden mit einer Pinzette werden entnommen.

### ***3.3.4. Präparation von Organen zur histologischen Untersuchung***

Das frisch entnommene Organ wird in eine kalte 0,9 %ige NaCl-Lösung gebracht und mittels feiner Pinzetten von anhängendem Binde- und Fettgewebe getrennt. Es folgt ein Längsschnitt des Pankreas in zwei Hälften, von denen die eine Hälfte fixiert (s.u.) und die andere Hälfte eingefroren wird.

#### *Einfrieren und Herstellung von Gefrierschnitten*

Die Pankreashälfte wird längs in ein vorher markiertes ‚Schiffchen‘ aus Aluminiumfolie gelegt und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung bedeckt. Daraufhin wird das Schiffchen auf flüssigen Stickstoff gesetzt. Das im Stickstoff schließlich untergetauchte eingefrorene Präparat wird weiter bei -80°C gelagert. Zum Schneiden wird es mit einem Tropfen Tissue-Tek auf die Objekthalterung des Kryostats angefroren. Die Schnitte werden bei -13°C Objekttemperatur und mit einer Schnittdicke von 9 µm angefertigt. Die auf Objektträger aufgenommenen Schnitte werden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und am folgenden Tag für 7 Minuten in -20°C kaltes Aceton getaucht. Es folgt eine nochmalige einstündige Trocknung. Zur Lagerung werden die Objektträger in Alufolie eingewickelt und bei -80°C aufbewahrt.

#### *Fixieren und Paraffinieren der Gewebeproben*

Die Pankreashälfte wird vor der Fixierung in fünf gleichgroße Teile zerschnitten.

- a) Die Gewebestücke werden in kaltes 10 %iges Formalin gelegt. Nach mindestens 24-stündiger Fixierung werden die Stücke in einer Entwässerungsreihe (Wasser bis 100 %iger Ethanol) entwässert.

b) Die Gewebestücke werden für 12 h in die frisch angesetzte Bouin-Fixierlsg. gelegt. Die Bouin-Lsg. wird danach abgegossen und die Gewebe mehrmals mit Wasser gespült, bis sich keine gelbe Farbe mehr löst. Dann werden die Proben in 70 %igen Ethanol gelegt.

Die Proben werden weiter entwässert und nach der Einlagerung in einem Lösungsvermittler so in Paraffin angeordnet, dass mehrere Gewebestückchen in einer Schnittebene liegen.

### *Herstellen von Paraffinschnitten*

Aus den paraffineingebetteten Präparaten werden am Mikrotom 5 µm-dünne Schnitte hergestellt, die auf Eiweißglycerin-beschichtete Objektträger aufgenommen werden und innerhalb von 48 Stunden bei RT trocknen. Der Entparaffinierung geht eine ca. zweistündige Erhitzung auf 55°C voran.

### *Entparaffinierung von Paraffinschnitten*

Nach 10-minütiger Lagerung im Xylolersatzlösungsmittel *Rothistol*, folgt eine absteigende Alkoholreihe (100 %-, 90 %-, 80 %-, 70 %-, 50%iger EtOH, *aqua dest.*) zur sukzessiven Bewässerung des Schnittes.

### **3.3.5. Übersichtsfärbung histologischer Schnitte**

#### ***Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)***

Zur Färbung legt man die Paraffinschnitte nach der Entparaffinierung (siehe 3.4.10.5) aus dem destillierten Wasser für 8 min in gefiltertes Mayer'sches Hämatoxylin, um sie hiernach kurz in kaltem destilliertem Wasser zu spülen und zur Bläuung für ca. 10 Minuten in warmes Leitungswasser zu stellen. Es folgt eine Entfärbung für ca. 30 s in einer wässrigen Lösung aus 70 %igem EtOH und 1 %iger Salzsäure, der sich ein wiederholtes Bläuen für ca. 5 min in warmem Leitungswasser anschließt. Zur Eosin-Gegenfärbung werden die Schnitte für 15 Sekunden in eine 1 %ige wässrige Eosinlösung getaucht und danach in 96 %igem Alkohol gespült. Die getrockneten Schnitte werden in *Rothistol* getaucht und mit Hilfe von *Entellan* eingedeckelt. Kryostatschnitte werden nur ca. 1 min in Hämatoxylinlösung gestellt und nach dem Spülen und Bläuen für 30 Sekunden in 96 %igen EtOH gehalten, dem einige Tropfen der 1 %igen Eosinlösung beigemischt sind. Es folgt ein kurzes Eintauchen in klaren 96 %igen EtOH. Danach läßt man die Schnitte an der Luft trocknen und deckelt schließlich mit *Entellan* ein (s. o.).

### 3.3.6. Immunhistologische Färbung

Es wurde die indirekte enzymatische Immunfärbung eingesetzt, bei welcher der an ein Antigen spezifisch gebundene Antikörper in einem weiteren Schritt detektiert und durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Als Enzyme wurden die Meerrettich-Peroxidase (HRP) und die alkalische Phosphatase (AP) verwendet; die alkalische Phosphatase war dabei an einen Sekundärantikörper (Esel-anti-Meerschwein) gekoppelt, der gegen den Primärantikörper (Meerschweinchen-anti-Insulin) gerichtet ist. In der Biotin-Avidin-Methode diente die Peroxidase als Enzym. An den biotinylierten Primärantikörper (Maus-anti-hCD4) bindet sich hierbei der Peroxidase-gekoppelte Avidin-Biotin-Komplex.

Zur Darstellung wurden Substrate verwendet, die in unmittelbarer Anwesenheit der Enzyme zu stabilen Farbkomplexen reagieren. Diese waren: Diaminobenzidin (DAB), ein brauner Farbstoff, der unter Wirkung von Peroxidase ausfällt, und Neufuchsin, das sich unter der Wirkung der Alkalischen Phosphatase mit Naphtol-As-Bi-Phosphat zu einem stabilen roten Farbstoff (Fast-red) entwickelt.

#### *3.3.6.1. Immunhistologischer Nachweis von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf Kryostatschnitten mit der Biotin-Avidin-Peroxidase Technik*

Die aufgetauten und getrockneten Kryostatschnitte werden für 7 min in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton fixiert. Zum Blocken der endogenen Peroxidase werden sie daraufhin für 15 Minuten in 0,3 %iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol, zum Blocken unspezifischer Bindungen werden die Schnitte dann 30 min in 10 %igem hitzeinaktiviertem Mausserum in TBS inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinylierten anti-hCD4-mAk erfolgt für 1 h bei RT. Anschließend werden die Schnitte (3 x 5 min) in TBS gewaschen. Zur Bindung mit dem Enzym sind die Präparate 30 Minuten lang mit einem Tropfen aus Peroxidase-gekoppeltem Avidin-Biotin-Komplex (1:500) in TBS überschichtet. Es folgen drei Waschschrte (3 x 5 min in TBS). Das DAB-Farbreagenz wird auf die Schnitte gegeben und die Farbreaktion nach ca. 5 Minuten durch ein Eintauchen der Schnitte in TBS gestoppt. Vor der Gegenfärbung in Hämatoxylin (siehe 3.3.5.) für 30 Sekunden, wird der Schnitt in aqua dest. gespült. Nach Beendigung der Färbung erfolgt das Eindeckeln mit Glyceringelatine.

#### *3.3.6.2. Immunhistologischer Nachweis von insulinhaltigen Zellen auf Paraffinschnitten des Pankreas mit der indirekten Alkalischen Phosphatase Technik*

Nach der Entparaffinierung werden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 15 min in 10%iges FKS in TBS getaucht. Es folgt eine Inkubation für 1 h bei RT mit dem Primärantikörper. Der Antikörper kann zwecks Wiederverwendung mittels Pipette

abgenommen werden, wonach man die Schnitte 3x5 min in TBS wäscht. Die Inkubation mit AP-gekoppelten Sekundär erfolgt für 1 Stunde bei RT, worauf ein erneuter Waschschrift stattfindet (3x5 min in TBS). Die Farbreaktion erfolgt in der Fast-red-Färbelösung für ca. 15 Minuten und wird durch Eintauchen in destilliertes Wasser gestoppt; danach werden die Schnitte für ca. 30 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt (siehe 3.3.5.). Nach Beendigung der Färbung werden die trockenen Schnitte mit Hilfe von erwärmter Glyceringelatine eingedeckelt.

### **3.3.7. Durchflußzytometrische Messung von Lymphozytenpopulationen und Aktivierungsmarkern**

Das Durchflußzytometer (FACS) dient der Analyse von Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Lichtstreuung und Fluoreszenzemission.

Lichtstreuung ist die Richtungsänderung eines einfallenden Lichtstrahls. Durch einen kleinen Partikel, wie eine Zelle, wird der größte Teil des einfallenden Lichtes in dessen Vorwärtsrichtung gestreut. Dieses Licht nennt man Vorwärtsstreulicht (FSC). Da größere Zellen das Licht stärker streuen, ist der FSC-Wert in der Durchflußzytometrie ein Maß für die Partikel- bzw. Zellgröße. Dasjenige Streulicht, welches im rechten Winkel zu seiner Einfallrichtung auftritt, nennt man Seitwärtsstreulicht (SSC). Dieses ist ein Maß für die Granularität der Zelle.

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um einen lichtemittierenden Prozeß, der durch die Bestrahlung mit Licht von geeigneter Wellenlänge ausgelöst wird. Das sogenannte Emissionslicht kann im FACS-Gerät gemessen werden. Bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe zeigen typische Emissionen. Sind die Zellen mit solchen Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. mit Hilfe von Antikörpern, markiert, können sie vom FACS-Gerät analysiert und dargestellt werden.

In der vorgestellten Arbeit wurde die direkte Immunfluoreszenz angewendet. Mit der Dreifarben-Analyse wurden jeweils zwei Oberflächenantigene und ein Aktivierungsmarker gleichzeitig in einer Probe untersucht.

Die Auswertung erfolgte mit dem Auswerteprogramm Cell Quest von *Becton-Dickinson*.

Folgende Antikörper kamen kombiniert zum Einsatz:

anti-CD8-FITC, anti-CD3-PE, anti-hCD4-PeCy5,  
anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-hCD4-PeCy5,  
anti-CD8-FITC, anti-CD69-PE, anti-hCD4-PeCy5,

anti-CD8-FITC, anti-CD71-PE, anti-hCD4-PeCy5,  
anti-Ratte IgG-FITC, anti-CD3-PE, anti-hCD4-PeCy5

Als Negativkontrollen dienten Proben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche nicht gegen Epitope der Lymphozyten gerichtet waren (Kontrollantikörper). Die Einstellungen der für die Mehrfachfarben-Analyse notwendigen jeweiligen Kompensationen der Fluoreszenzen (FL) wurden mit folgenden Kombinationen aus Kontrollantikörper und spezifischen Antikörpern durchgeführt:

Anti-CD-8FITC, PE-markierter Kontrollantikörper, PeCy5-markierter Kontrollantikörper  
->Einstellung der Kompensation FL2-FL1 (FITC-Kanal)

FITC-markierter Kontrollantikörper, anti-CD8-PE, PeCy5-markierter Kontrollantikörper  
->Einstellung der Kompensation FL 1-FL2, FL3 (PeCy5-Kanal)-FL2

FITC-markierter Kontrollantikörper, PE-markierter Kontrollantikörper, anti-hCD4-PeCy5  
->Einstellung der Kompensation FL 2-FL3.

#### 3.3.7.1. Durchflußzytometrische Analyse des Blutes

Pro Maus werden unter Äther-Narkose retrobulbär ca. 80 µl Blut mittels Hämatokritröhrchen entnommen, in einem 500 µl *Eppendorf*-Tube mit einem Tropfen Heparin-Lösung und 25 µl anti-CD16/32 vermischt und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Pro FACS-Röhrchen werden 25 µl des vorbehandelten Blutes mit den vorgelegten Antikörpern gemischt und ca. 30 min auf Eis, im Dunkeln inkubiert. Dann wird diese Zellsuspension zentrifugiert (1200 U/min, 5 min, RT), das Zellpellet mit jeweils 1 ml FACS-Lysepuffer (*Becton-Dickinson*) pro Röhrchen resuspendiert und für weitere 10 min inkubiert (RT, im Dunkeln). Die Zellsuspension wird wieder zentrifugiert (1200 U/min, 5 min) und das Zellpellet in 4 ml FACS-Puffer aufgenommen. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Schließlich wird das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur FACS-Messung unter Lichtabschluß bei 4°C aufbewahrt.

#### 3.3.7.2. Durchflußzytometrische Analyse von Milzzellen

Die aus dem frisch getöteten Tier entnommene Milz wird mittels einer Schere zerkleinert und mit einem Injektionsspritzen-Stempel und 50 ml RPMI mit 10% FKS (RPMI-10) durch das Sieb des *cell strainer* gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wird zentrifugiert (1200 U/min, 5 min) und zur Erythrozytenlyse das Zellpellet in 10 ml 4°C-kalten Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach genau 80 Sekunden werden dazu 40 ml RPMI-10 hinzugegeben. Die Zellen werden abzentrifugiert (1200 U/min, 5 min) und der Waschschrift einmal wiederholt.

Die Milzzellen werden in 1 ml RPMI-10 aufgenommen und gezählt. Für die FACS-Färbung werden  $1 \times 10^6$  Zellen/Röhrchen verwendet, die mit dem vorgelegten Antikörpergemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert werden und nach einem Waschschrift (FACS-PBS, 1200 U/min, 5 min) in 200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und gemessen werden.

### **3.3.8. Zellkulturtechniken**

Die Behandlung der Zellen erfolgte an einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Hilfsmitteln.

#### *Einfrieren und Auftauen der Zellen*

##### *Einfrieren*

Die Zellen sind zur Langzeitlagerung eingefroren. Das Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxyd (DMSO) verhindert die Kristallisation des intrazellulären Wassers. Zum Einfrieren werden die Zellen in FKS auf ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml/Einfriereröhrchen eingestellt. Der Zellsuspension wird DMSO (10%) zugesetzt und zunächst bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren, bevor die Röhrchen zwecks Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

##### *Auftauen*

Die Zellen werden bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und möglichst schnell in FKS transferiert. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI1640- Medium werden die Zellen gezählt und im Kulturmedium resuspendiert.

#### *Bestimmung der Zellkonzentration von Einzelzellsuspensionen*

Aus der Zellsuspension werden 10  $\mu$ l entnommen, mit 90  $\mu$ l Trypanblau gemischt und in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Aus der Anzahl der lebendigen Zellen eines Großquadrates, bestehend aus jeweils 16 Kleinquadraten, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 10 und  $1 \times 10^4$  ergibt sich die Zellzahl pro ml.

### **3.3.9. Hybridomzellkultur zur Gewinnung monoklonaler Antikörper**

Die verwendete Zelllinie 53.6-72 ist ein Rattenhybridom, welches Antikörper des Isotyps IgG2a produziert, die gegen das murine CD8-Molekül gerichtet sind (LEDBETTER u. HERZENBERG, 1979). Die Rattenantikörper besitzen eine schwache pH-abhängige Bindungsfähigkeit gegenüber einem als Protein-G bezeichneten, aus Staphylokokken stammenden Molekül. Mittels Säulen, in denen das Protein-G an ein Trägermaterial gekoppelt wurde, können die an das Protein-G bindenden Ak aus dem Kulturmedium gewonnen werden.

### *Vorreinigung des fötalen Kälberserums*

Die starke Affinität von Rinder-Immunglobulinen für das Protein-G macht eine Vorreinigung des für die Kultivierung des Hybridoms verwendeten Kälberserums notwendig (DARBY, 1993). Dazu werden jeweils 100 ml supplementiertes RPMI, das 20 %ig mit fötalem Rinderserum versetzt ist, über eine 5 ml Protein-G-Säule mit der Durchlaufgeschwindigkeit von 1 ml/min gebracht. Der Durchlauf wird sterilgefiltert und 1:1 mit RPMI gemischt, um schließlich als Kulturmedium eingesetzt zu werden.

### *Kultivierung des Hybridoms 53.6.72 in der mini-perm Kultur*

Um Kulturüberstand zu erhalten, der reich an den Ak des kultivierten Hybridoms ist, wurde die *mini-perm*-Zellkultivierung gewählt. Bei dieser Methode können Zellen in hoher Dichte kultiviert werden, wodurch sich deren Produkte in hoher Konzentration ansammeln.

Die Kultivierung im *mini-perm* Kulturgefäß beruht auf der Trennung eines Versorgungsmoduls vom Produktionsmodul mittels einer Dialysemembran. Während sich Zellen und Zellprodukte im Produktionsmodul ansammeln, stellt das Medium im Versorgungsmodul die benötigten Nährstoffe bereit. Das Medium im Versorgungsmodul wird regelmäßig ausgetauscht und gleichzeitig Zellen und Zellprodukte aus dem Produktionsmodul entnommen. Damit eine ausreichende Diffusion der Nährstoffe sichergestellt ist, wird das Kulturgefäß ständig auf einer speziellen Rollapparatur gerollt.

Bei der Kultivierung der Zelllinie 53.6.72 zur Antikörperproduktion werden 35 ml Zellsuspension in der Konzentration von  $2 \times 10^6$  /ml mit Medium (RPMI-Glutamax, 10% vorgereinigtes fötales Kälberserum) im Produktionsmodul kultiviert. In das Versorgungsmodul kommen 450 ml des Versorgungsmediums (RPMI-Glutamax, 2 mM/l Na-Pyruvat, 0,2 mM/l nicht-essentielle Aminosäuren, Gentamycin). Wöchentlich werden aus dem Produktionsmodul mittels einer 25 ml-Injektionsspritze 20 ml der Zellsuspension entnommen und durch neues Medium ersetzt. Am selben Tag wird das gesamte Medium aus dem Versorgungsmodul ausgetauscht. Das *mini-perm*-Zellkulturgefäß wird bei 37°C unter 5%-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 3,5 U/min gerollt.

### *Reinigung mittels der Affinitätschromatographie*

Der Ak wurde mittels einer Protein-G-beladenen Säule isoliert.

Dazu wird der Kulturüberstand durch die Säule gegeben und danach der an die Säule gebundene Ak mittels einer sauren Elutionslösung aus der Säule gespült. Während des

Durchlaufs wird die UV-Extinktion der durch die Säule durchgelaufenen Lösung bei 278 nm Wellenlänge kontinuierlich gemessen, um den Teil der Lösung, der Protein erhält, zu erkennen. Vor dem Kulturüberstand gehen 30 ml des Äquilibriumspuffer durch die Säule (2 ml/min).

100 ml Kulturüberstand werden bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min durch die Säule geschickt. Zum Entfernen nicht-gebundener Probenbestandteile, werden hiernach 10 ml Äquilibriumspuffer (0,8 ml/min) durch die Säule gepumpt. Schließlich wird der Ak von der Säule mittels 20 ml des sauren Elutionspuffers eluiert (2 ml/min). Der Ak befindet sich in dem Teil der Lösung, bei welchem die Extinktion ansteigt. Dieses den Ak enthaltende Eluat wird gesondert aufgenommen und schließlich mit dem Neutralisationspuffer auf pH 7,4 eingestellt.

### *Bestimmung des Antikörpergehaltes des Eluats*

Der Antikörpergehalt des Eluats (=G) wird nach photometrischer Bestimmung bei 280 nm der Probe (100 µl) gegenüber dem Leerwert (neutralisierter Eluatpuffer-Durchlauf vor Ak-Eluierung) nach folgender Gleichung berechnet:

Absorption  $\times 1,3 = G$  mg/ml.

### *Dialyse des Antikörpereluats*

Das auf pH 7,4 eingestellte Antikörpereluat wird gegen PBS dialysiert. Dazu wird ein Dialyseschlauch mit dem Eluat gefüllt, verschlossen und für 6 Stunden bei RT in 2 Litern PBS gelegt, welches halbstündig erneuert wird.

### **3.3.10. In vivo-Behandlung mit monoklonalen Antikörpern**

Mit Hilfe der CD4/DR17-transgenen Maus kann eine spezifische anti-CD4-mAk-Therapie mit anti-hCD4-mAk erprobt werden. Für die vorgelegten Studien waren zwei verschiedene anti-hCD4-mAk verfügbar: MAX 16 H 5 und MAX 12 F 6. Die Klone, die zur Erzeugung der monoklonalen Antikörper dienten, waren beide mittels Immunisierung von Mäusen mit einem hCD4-transfizierten Maushybridom hergestellt worden (GUSE et al., 1993) und stammen aus dem Institut für Klinische Immunologie der Universität Leipzig. Als depletierender anti-CD8-mAk diente der Rattenantikörper des Subisotypes IgG2a aus dem Klon 53.6.72 (LEDBETTER u. HERZENBERG, 1979).

Die mAk lagen in der Konzentration von 1 mg/ml (bzw. der anti-CD8-mAk in der Konzentration von 0,5 mg/ml) in PBS vor und wurden jeweils in der Dosis von 15 (bzw. der

anti-CD8-mAk in der Dosierung von 7,5)  $\mu\text{g/g}$  K.G. intraperitoneal verabreicht. Diese Dosierung wurde von LAUB (1999; 2002) im Rahmen von Studien zur Toleranzinduktion ermittelt. Bei dieser Dosis konnte eine Beeinflussung der Antikörperbildung nach Immunisierung und die Teildepletion der  $\text{CD4}^+$  T-Zellpopulation gezeigt werden.

## 4. Ergebnisse

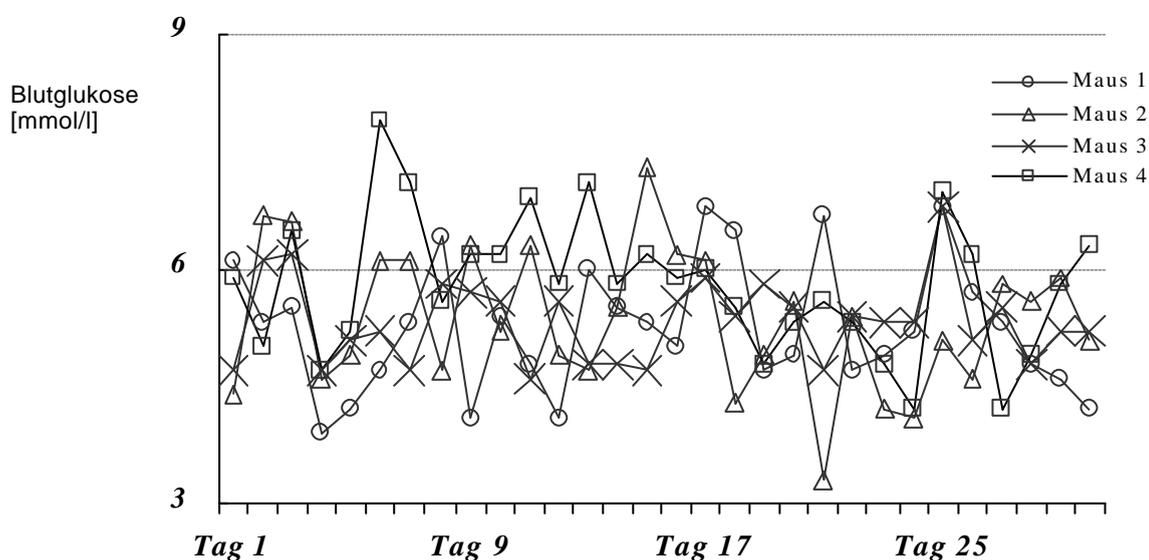
### 4.1. Voruntersuchungen

#### 4.1.1. Festlegung eines Schwellenwertes für den Begriff der Hyperglykämie bei CD4/DR17-Mäusen

Während für den humanen Typ 1 Diabetes von der WHO strikte Kriterien zur Diagnose der Krankheit definiert wurden, gibt es für einen tierexperimentellen Diabetes keine Standardwerte. Der Begriff Hyperglykämie bei der Spezies Maus wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich gehandhabt. In dieser Arbeit ist der Begriff Hyperglykämie als ein unter definierten Bedingungen (3.3.2.) gemessener Blutglukosewert = 9,5 mmol/l festgesetzt worden.

Messungen der Blutglukose gesunder unbehandelter CD4/DR17-Mäuse wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob Schwankungen des Blutglukosewertes bei dieser Mauslinie auftreten, die als Hyperglykämien zu bezeichnen wären.

Von 4 Mäusen wurden über 30 Tage lang täglich die Blutglukosewerte zwischen 9 und 10.30 Uhr bestimmt (3.3.2.) (Abb.2).



**Abb.2: Tägliche Blutglukosewerte von vier unbehandelten CD4/DR17-Mäusen über einen Zeitraum von 30 Tagen**

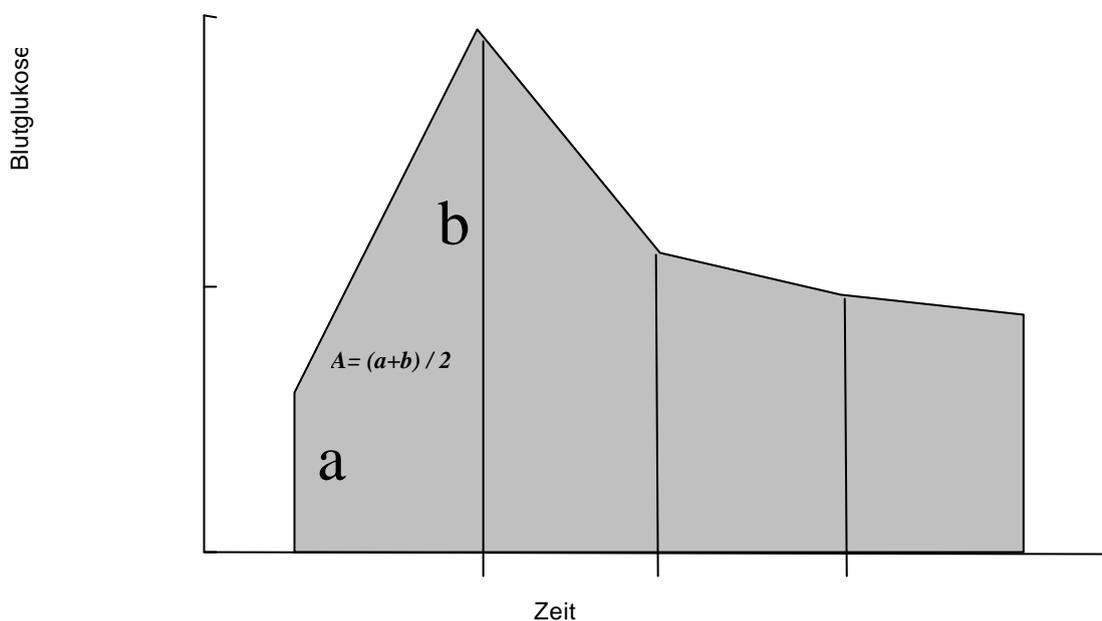
Die Blutglukosewerte der vier unbehandelten Mäuse schwanken im Meßzeitraum von 30 Tagen um den Mittelwert 5,43 mmol/l. Der Mittelwert der Standardabweichungen beträgt

0,78. Der in dieser Zeitspanne höchste Blutglukosewert einer Maus ist 7,9 mmol/l. Der niedrigste Blutglukosewert beträgt 3,9 mmol/l.

Somit treten unter den festgelegten Messbedingungen in der unbehandelten CD4/DR17-Maus keine Hyperglykämien auf, wenn Hyperglykämie als Blutglukosewert über 9,5 mmol/l definiert wird.

#### 4.1.2. Der Orale Glukose-Toleranz-Test bei unbehandelten CD4/DR17-Mäusen

Ziel war es, zu prüfen, ob der OGTT (3.3.2.) bei der CD4/DR17-Maus eine geeignete Methode darstellt, die individuelle Fähigkeit zur Blutglukoseregulierung nach oraler Glukosezufuhr reproduzierbar zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden an 26 unbehandelten Mäusen innerhalb einer Woche jeweils zwei OGTTs durchgeführt. Von jeder Maus wurde die Fläche unterhalb der Blutglukosekurve errechnet: Diese Fläche ergibt sich aus der Summe ihrer Teilflächen (siehe Abb.3). Jede dieser Teilflächen ist ein Trapez, dessen Fläche (A) mit Hilfe der Trapezformel bestimmt wird:  $A = [(a+b)/2] \times c$ , wobei c das konstante Zeitintervall (15 Minuten) ist, für das der Wert 1 eingesetzt wurde. a und b sind die Blutglukosewerte an zwei aufeinanderfolgenden Meßzeitpunkten.



**Abb.3: Schematische Darstellung der OGTT-Blutglukosekurve; Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve als die Summe von Teilflächen (A)**

Der Mittelwert aus den Flächen der Blutglukosekurven 26 unbehandelter CD4/DR17-Mäuse an zwei unterschiedlichen Tagen ist bestimmt worden. Er beträgt 27,8 Flächeneinheiten. Die Standardabweichung ist 4,5. Der Mittelwert der Standardabweichungen zwischen den Flächen

der Kurven ein und derselben Maus zu unterschiedlichen Zeitpunkten beträgt dagegen nur 1,3. Dies Werte zeigen, dass beim OGTT individuell unterschiedliche Kurven auftreten und die Werte der Flächen unterhalb der Blutglukosekurven sich beim jeweiligen Tier mit einer Schwankungsbreite von durchschnittlich 4,7% reproduzieren lassen. Die Flächenwerte zwischen verschiedenen Mäusen unterscheiden sich dagegen im Durchschnitt um 16%.

In den folgenden Experimenten wurde daher von jeder Maus die individuelle Flächenveränderung zwischen zwei Meßtagen (vor und nach Behandlungsbeginn) bestimmt. Mittelwerte einer Versuchsgruppe wurden aus solchen Einzelwerten der Tiere berechnet (4.2.2).

**4.1.3. Immunhistochemische Bestimmung des Insulingehaltes von Langerhans’schen Inseln**

Eine intakte Langerhans’sche Insel kann durch das Mikroskop ohne jegliche Anfärbung in einem histologischen Schnitt des Pankreasgewebes als typischer Zellverband erkannt werden. Da funktionsfähige  $\beta$ -Zellen der Pankreasinseln Insulin produzieren und speichern, führt eine immunhistochemische Anfärbung des Insulins (3.3.6.2.) zu der Anfärbung der Inselfläche (siehe Abb.4).

Nach der Behandlung der CD4/DR17-Maus mit STZ (3.3.1.) ist eine Abnahme der Größe der insulinhaltigen Fläche der Inseln zu sehen. Zur Quantifizierung des Insulingehaltes wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Inselfläche mit Hilfe eines digitalen Meßsystems bestimmt. Dabei wurden folgende Farbschwellenwerte eingegeben: Rot 95-180, grün 25-90, blau 35-105. Nur eindeutig als Inseln zu erkennende Strukturen wurden bewertet, wenn sie mindestens einen Durchmesser von 50  $\mu$ m aufwiesen. Dieser Schwellenwert wurde eingeführt, um nicht verstreute, stark gefärbte, einzelne  $\beta$ -Zellen in die Bewertung mitaufzunehmen. Diese könnten die Ergebnisse verfälschen, da eventuell vorhandene ungefärbte Einzelzellen nicht als  $\beta$ -Zellen zu erkennen sind.

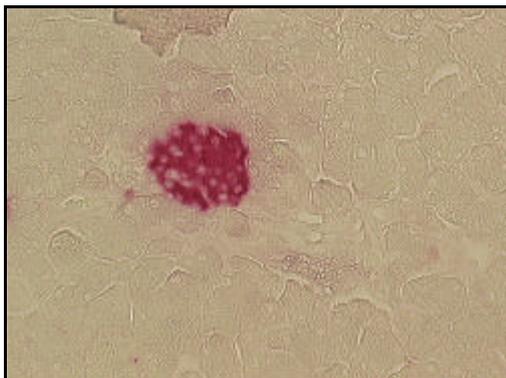
Von zwei Mäusen, einer unbehandelten und einer mit 5x40 mg/kg K.G. STZ-behandelten Maus (Tag 20), sind in folgender Tabelle exemplarisch sämtliche Werte aus fünf verschiedenen Pankreasschnitten dargestellt. Jeder Wert drückt den prozentualen Insulinanteil einer einzelnen Insel aus:

Anzahl bewerteter Inseln		Anteil insulinhaltiger Inselfläche, Einzelwerte [%]	Mittelwert [%]	Standardabweichung
Unbehandelte CD4/DR17-Maus	8	100, 90, 87, 77, 76, 44, 39, 38	69	23

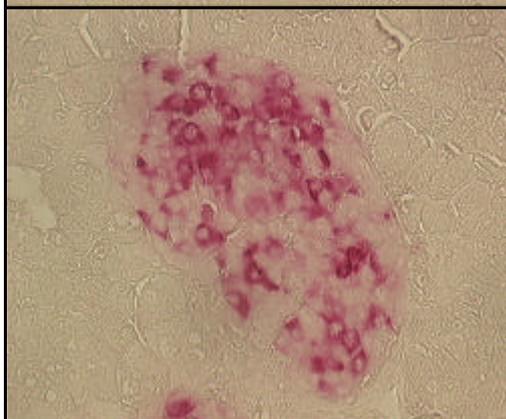
Anzahl bewerteter Inseln		Anteil insulinhaltiger Inselfläche, Einzelwerte [%]	Mittelwert [%]	Standardabweichung
STZ-behandelte CD4/DR17-Maus	8	63, 52, 47, 40, 35, 31, 24, 7	37	16

**Tabelle 5 (erster Teil siehe vorige Seite unten): Prozentuale Anteile der insulinhaltigen Fläche (%) in einzelnen Inseln einer unbehandelten sowie einer STZ-behandelten CD4/DR17-Maus sowie deren Mittelwerte**

Die Mittelwerte des Anteils insulinhaltiger Zellen in Pankreasinseln sind ein Maß für den Insulingehalt. Die durch die STZ-Behandlung initiierte  $\beta$ -Zell-Zerstörung schlägt sich in einem geringeren Insulingehalt der Inseln nieder. Neben solchen Inseln, die weniger als zehn Prozent insulinhaltige Fläche aufweisen, finden sich im Pankreas der STZ-behandelten Mäuse auch Inseln mit einem nach wie vor hohen Insulinanteil. Auch bei unbehandelten Mäusen unterscheiden sich die Inseln in ihrem Anteil insulinhaltiger Zellen voneinander; neben Inseln, die vollständig mit Insulin „gefüllt“ sind, gibt es andere mit einem weniger als halb so großem Anteil insulinhaltiger Strukturen.



**Abb.4: Immunhistochemische Darstellung des Insulins (rotgefärbt) in einer intakten Insel; Paraffinschnitt Fast-red Färbung ohne Gegenfärbung**



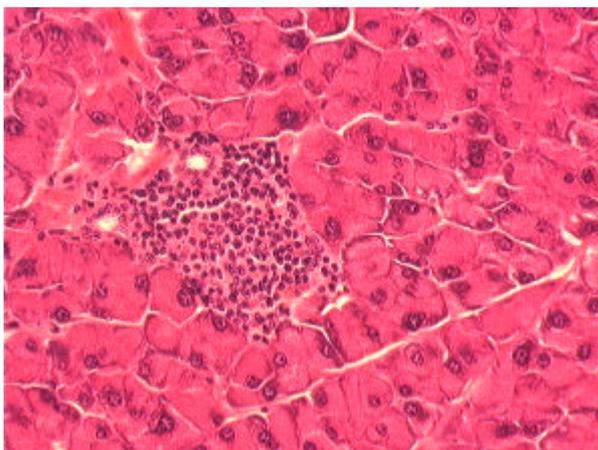
**Abb.5: Immunhistochemische Darstellung des Insulins (rotgefärbt) in einer Insel aus einer STZ-behandelten Maus; Paraffinschnitt, Fast-red Färbung ohne Gegenfärbung**

#### **4.1.4. Das Auftreten und die Beurteilung einer Insulinitis**

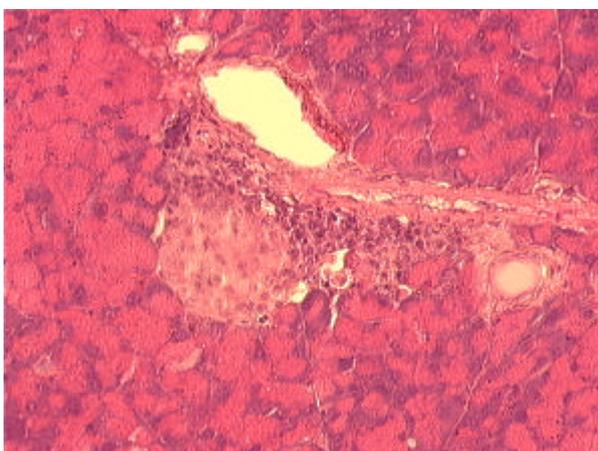
Ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung eines Typ 1 Diabetes von anderen Diabetestypen ist das Auftreten von Entzündungen in den Inseln (Insulinitis). Diese Entzündungen sind Kennzeichen des krankheitsverursachenden Autoimmungeschehens und haben wahrscheinlich

auch beim MLD-STZ Diabetes eine pathogenetische Bedeutung. Zur Bewertung der Entzündungsinfiltrate der Pankreasinseln wurde den Inselinfiltrationen jeder Insel die Rangzahl einer ordinalen Skala zugeordnet: 0=keine Entzündungen (<5 Zellen), I= Periinsulitis ( $\geq 5$  mononukleäre Entzündungszellen um die Insel) oder II=Insulitis ( $\geq 5$  mononukleäre Entzündungszellen innerhalb der Insel).

In HE-gefärbten Pankreas-Paraffinschnitten (3.3.5.) unbehandelter CD4/DR17-Mäuse befinden sich in bzw. um die Inseln keine Ansammlungen mononukleärer Zellen. In unmittelbarer Gefäßnähe können jedoch vereinzelt, mononukleäre Zellen zu sehen sein, die nicht als Ausdruck einer Entzündung anzusehen sind. Im Gegensatz dazu zeigten sich in den Pankreasschnitten von STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen am Tag 20 nach STZ-Behandlung deutlich Infiltrate um die Inseln, die als Periinsulitiden (I) eingestuft worden sind (Abb.6), neben Infiltraten, die in die Inseln hineinreichen und als Insulitiden (II) zu bezeichnen sind (Abb.7). Infiltrationen unterschiedlichen Grades kamen auf Pankreasschnitten ein und derselben Maus vor. Ebenso waren im Pankreas behandelter Mäuse intakte Inseln ohne Ansammlungen von Entzündungszellen vorzufinden.



**Abb.6: Periinsulitis (Insulitis Grad I) in einer Pankreasinsel aus einer mit 5x40 mg/kg STZ-behandelten CD4/DR17-Maus (Tag 40 nach Beginn der STZ-Behandlung); Paraffinschnitt, HE-Färbung**



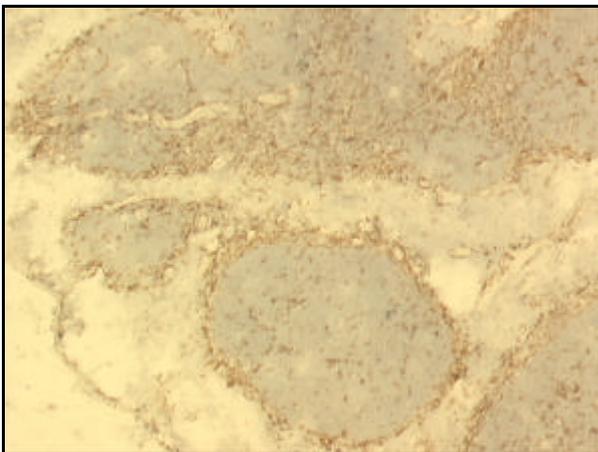
**Abb.7: Insulitis (Insulitis Grad II) in einer Pankreasinsel aus einer mit 5x40 mg/kg STZ-behandelten CD4/DR17-Maus (Tag 40 nach Beginn der STZ-Behandlung); Paraffinschnitt, HE-Färbung**

#### **4.1.5. Immunhistochemische Detektion von CD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz**

Mit Hilfe der Immunhistologie ist es möglich, Zellpopulationen anhand von Markern zu differenzieren. Im MLD-STZ-Modell der C57BL/6-Maus sind je nach Entzündungsstadium Makrophagen und Lymphozytenpopulationen in den Insulitiden dargestellt worden. Zur Beantwortung der Frage, ob die Expression der Transgene – des humanen CD4 und des DR17-Moleküls – die Beteiligung der CD4<sup>+</sup> Zellen an der Insulitis beeinflusst, wurden hCD4<sup>+</sup> Zellen immunhistochemisch in Entzündungsinfiltraten detektiert (siehe 4.3.2.5).

Die Methode (3.3.6.1.) wurde an Kryostatschnitten der Milz etabliert. Weiterhin dienen Milzschnitte im Rahmen der Detektion von hCD4<sup>+</sup> Zellen im Pankreas als Positivkontrollen.

Die Anfärbung von hCD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz einer CD4/DR17-Maus zeigt ein für die Milz typisches Verteilungsmuster: CD4<sup>+</sup> Zellen liegen manschettenförmig um die sogenannten Keimzentren (Abb.8).



**Abb.8: Immunhistochemische Darstellung von hCD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz (braungefärbt); Kryostatschnitt mit DAB-Färbung und Hämatoxylin-Gegenfärbung,**

#### **4.1.6. Durchflußzytometrische Analyse des Blutes von CD4/DR17-Mäusen und transgenen Segreganten**

Die CD4/DR17-Maus ist ein Kreuzungsprodukt aus unterschiedlichen transgenen Mäusen (3.1.1.). Bei ihrer Weiterzucht traten Segreganten auf, die in Experimenten eingesetzt wurden, um die Bedeutung der Transgene für die STZ-Diabetes-Pathogenese zu erforschen (4.2.). Dazu musste aber geprüft werden, ob in den CD4-defizienten (CD4<sup>-</sup>) Mäusen bzw. in den CD4-defizienten Mäusen, die das DR17 exprimieren (CD4<sup>-</sup>/DR17), das fehlende CD4-Molekül allein zum Verlust der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation führt, ohne dass andere Störungen im Bild der Lymphozytenpopulationen auftreten.

Hierzu wurden die Zellpopulationen im peripheren Blut von CD4/DR17-Mäusen und von solchen Segreganten bestimmt und miteinander verglichen, die aufgrund von Analysen mit der Polymerasekettenreaktion-Methode, die vom Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover ausgeführt wurden, weder Gene für das humane noch für das murine CD4-Molekül aufwiesen.

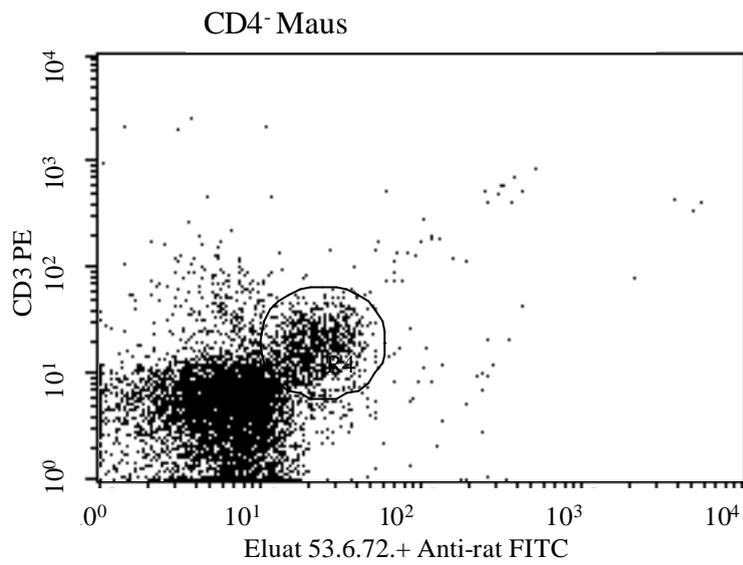
Die FACS-Analyse (3.3.7.), die die Zellmarker CD4, CD8 und CD3 einbezog, zeigte, dass sich im peripheren Blut der CD4<sup>-</sup>/DR17<sup>-</sup> und CD4<sup>-</sup>-Mäuse keine Population von CD3<sup>+</sup> Zellen darstellt, die sich nicht gleichzeitig als CD8<sup>+</sup> Zellen erweisen (Abb.9). Die Zahl der CD3<sup>+</sup> Zellen ist bei diesen Tieren im Vergleich zu CD4/DR17-Mäusen um den Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen verringert. Daher sind diese Tiere als Vergleichsgruppe für Experimente geeignet, die die Rolle der CD4<sup>+</sup> Zellen untersuchen.

#### **4.1.7. Aufreinigung eines monoklonalen, gegen das murine CD8-Molekül gerichteten Antikörpers aus dem Kulturüberstand des Hybridoms 53.6.72**

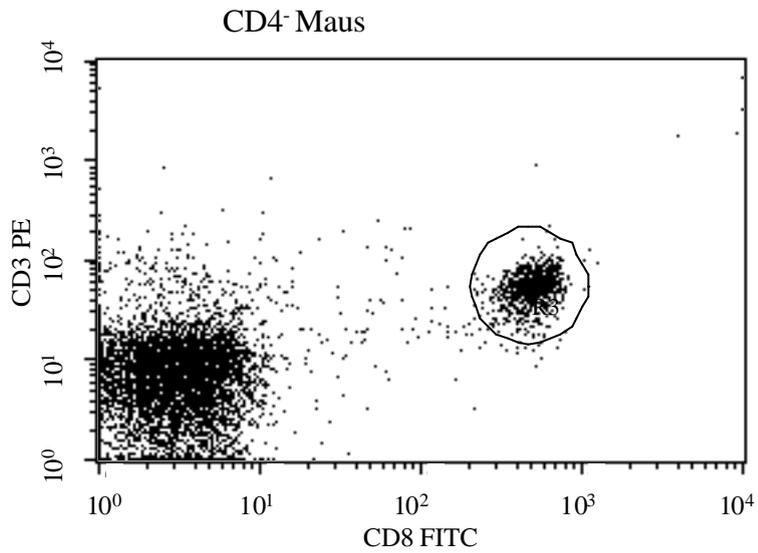
Für die anti-CD4-Ak-Behandlungen wurden mAk-Präparationen benutzt, die im Institut für klinische Immunologie, Abteilung Biotechnologie für die zukünftige therapeutische Verwendung am Menschen hergestellt worden sind. Der anti-CD8-mAk zur *in vivo* Behandlung musste dagegen für diese Studien erst in ausreichender Menge produziert und gereinigt werden.

Aus insgesamt 200 ml Hybridom-mini-perm-Kulturüberstand wurden 18 ml Eluat mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml gewonnen (3.3.9.). Dr. R. Brecht vom Institut für klinische Immunologie der Universität Leipzig, Bereich Biotechnologie, überprüfte die Reinheit des Eluates mittels einer Protein-Silberfärbung und einem nachfolgenden Westernblot nach dessen elektrophoretischer Auftrennung. Im Eluat identifizierte er eine einzelne Proteinbande als Rattenimmunglobulin und wies damit die Reinheit der Präparation nach.

Mittels FACS-Analyse (3.3.7.1.) wurde die Bindungsspezifität des Eluates ermittelt. Die Zellen aus dem Mausblut einer CD4/DR17-Maus sowie einer CD4-defizienten Maus, an die sich die Ak des Eluates hefteten, stellten sich nach Färbung mit einem gegen Rattenimmunglobulin gerichteten FITC-markierten Antikörper dar. Die Doppelfärbung mit markierten anti-CD3-Antikörpern zeigt, dass das Eluat an eine CD3<sup>+</sup> Zell-Population bindet (Abb.9). Diese Population entspricht in ihrer Größe der CD8<sup>+</sup> Zellpopulation, die durch einen kommerziell erhältlichen anti-CD8-mAk in einer parallelen Analyse der Blutprobe dargestellt werden konnte (Abb.10).



**Abb.9:** FACS-Dot-Plot-Darstellung der 53.6.72.-markierten, CD3-positiven Zellpopulation (umrandet); FACS-Färbung des Blutes einer CD4<sup>-</sup>-Maus



**Abb.10:** FACS-Dot-Plot-Darstellung der CD8- und CD3-doppelpositiven Zellpopulation (umrandet); FACS-Färbung des Blutes einer CD4<sup>-</sup>-Maus

### 4.2. Der MLD-STZ-Diabetes in der CD4/DR17-Maus. Die Diabetogene Wirkung von STZ in Abhängigkeit von der applizierten Dosis

Um die Empfindlichkeit der CD4/DR17-Maus gegenüber der diabetogenen Wirkung von STZ zu untersuchen, wurden 16 Mäuse (4 Gruppen) an fünf aufeinander folgenden Tagen mit unterschiedlichen Mengen an STZ behandelt:

Gruppe 1:	40 mg STZ / kg Körpergewicht	Tag 0-4
Gruppe 2:	80mg STZ / kg Körpergewicht	Tag 0
	40 mg STZ / kg Körpergewicht	Tag 1-4
Gruppe 3:	50 mg STZ / kg Körpergewicht	Tag 0-4
Gruppe 4:	60 mg STZ / kg Körpergewicht	Tag 0-4

Tabelle 6: Behandlungsschema zur Untersuchung einer dosisabhängigen STZ-Wirkung bei der CD4/DR17-Maus

#### 4.2.1. Entwicklung des Blutglukosespiegels der CD4/DR17-Maus nach STZ-Behandlung

Die Blutglukosespiegel wurden in zweitägigem Abstand bestimmt. In jeder Behandlungsgruppe traten hyperglykämische Blutglukosewerte auf (Abb.11 u. 14). Die höchsten BG traten bis zum Tag 40 auf. Die BG aller Mäuse haben sich am Tag 70 weitgehend normalisiert (siehe auch 4.2.3). Die Höhe der mittleren Blutglukosewerte einer Versuchsgruppe korrelierte mit der Dosis des verabreichten STZ. Keine der Mäuse zeigte während des Versuchsverlaufes Anzeichen von Störungen des Allgemeinbefindens.

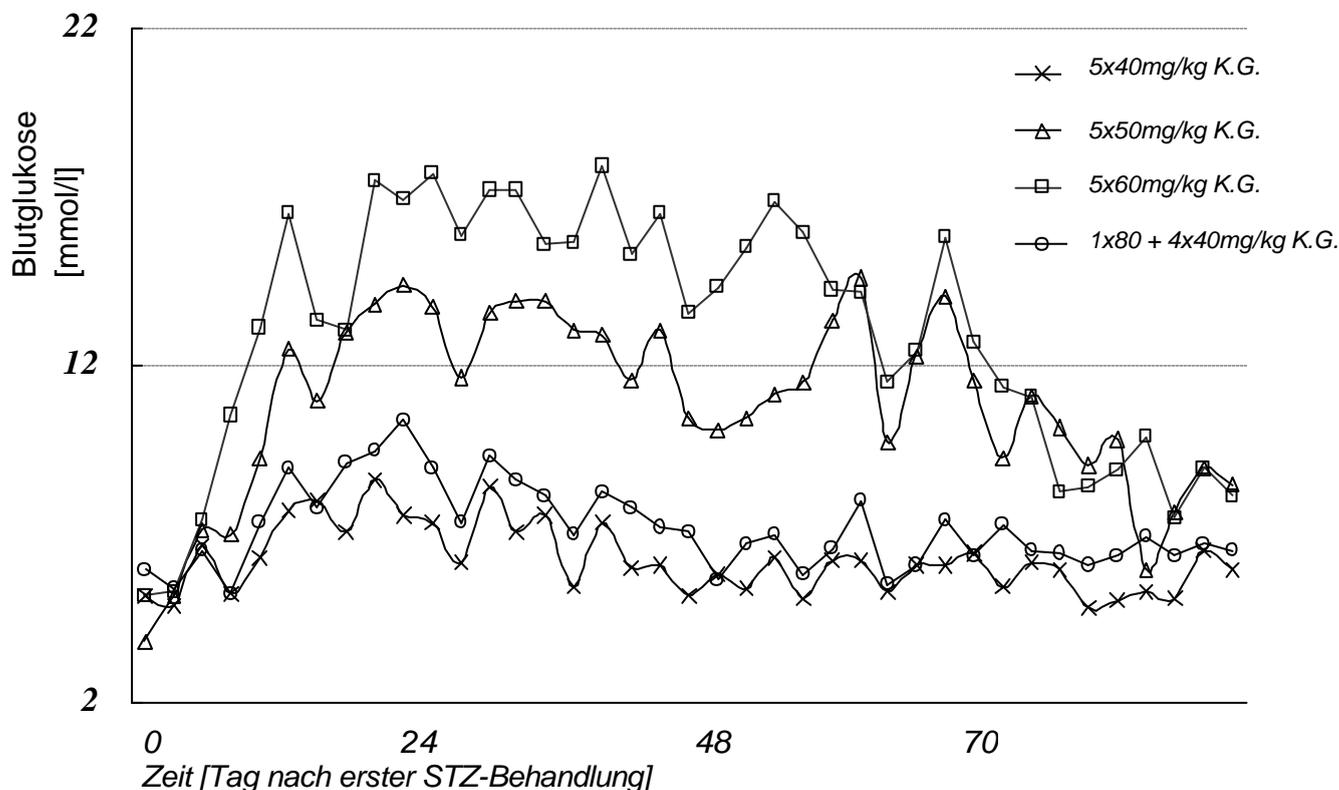


Abb.11: Verlauf der Blutglukosemittelwerte (Messungen im Abstand von jeweils zwei Tagen) von CD4/DR17-Mäusen die mit unterschiedlichen Dosen an STZ behandelt wurden (Gruppen à 4 Mäuse)

#### 4.2.2. Zunahme der Fläche unterhalb der Blutglukosekurve des OGTT nach STZ-Behandlung

Beim Oralen Glukose-Toleranz-Test misst man die Veränderung des BG nach oraler Aufnahme von Glukose zu definierten Zeitpunkten und erhält mit einer solchen Blutglukosekurve ein Maß für die Fähigkeit des Organismus zur unmittelbaren Blutglukosehomöostase. Auf die Aufnahme von Glukose und den Anstieg der Blutglukose reagiert der gesunde Säugetierorganismus mit der Ausschüttung von Insulin, wodurch der Blutglukosespiegel wieder sinkt. Beim Typ 1 Diabetes führt die Zerstörung von  $\beta$ -Zellen dazu, dass von weniger  $\beta$ -Zellen Insulin ausgeschüttet werden kann. Hat die Zellzerstörung eine kritische  $\beta$ -Zellmasse betroffen, manifestiert sich dies in der mangelhaften Regulation des Blutglukosespiegels.

Eine starke Zerstörung der  $\beta$ -Zellen bzw. der Störung ihrer Funktionen in Folge der STZ-Behandlung zeigte sich bei der CD4/DR17-Maus in erhöhten Blutglukosewerten (4.2.1).

Ein weiteres Kriterium für die Beurteilung der funktionellen Schädigung der Pankreasinseln wird mit der Kurvenfläche des OGTT ermittelt (Abb.12). Die Zunahme dieser Fläche ist ein Zeichen für die Verminderung der Glukosetoleranz. Dieses Phänomen trat in allen STZ-behandelten Tieren auf; selbst in Tieren, bei denen bis zu diesem Zeitpunkt keine Hyperglykämie gemessen worden war. Mit dem OGTT kann somit eine Störung der Blutglukosehämostase auch dann erkannt werden, wenn sie mit der Bestimmung des normalen Blutglukosewertes nicht diagnostiziert wird.

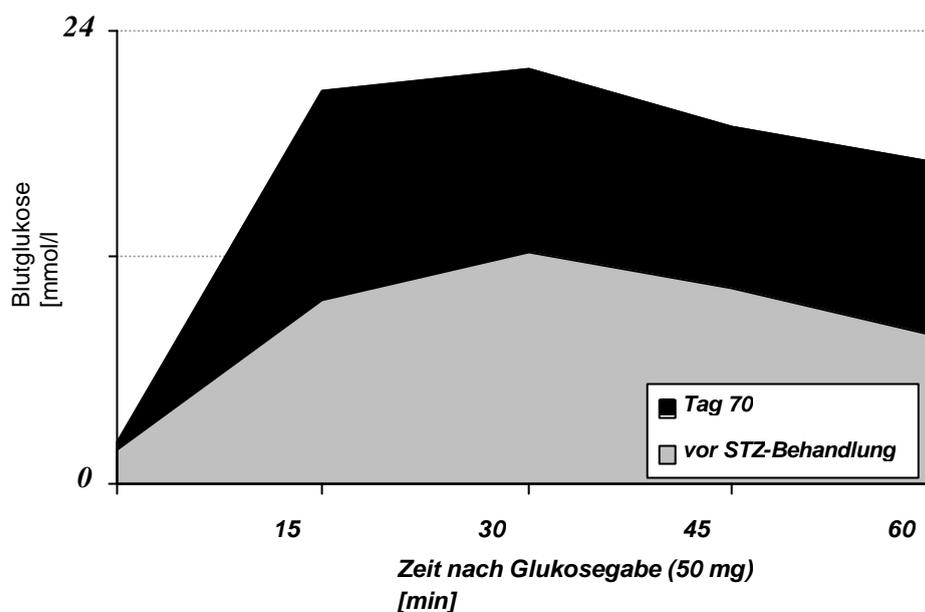
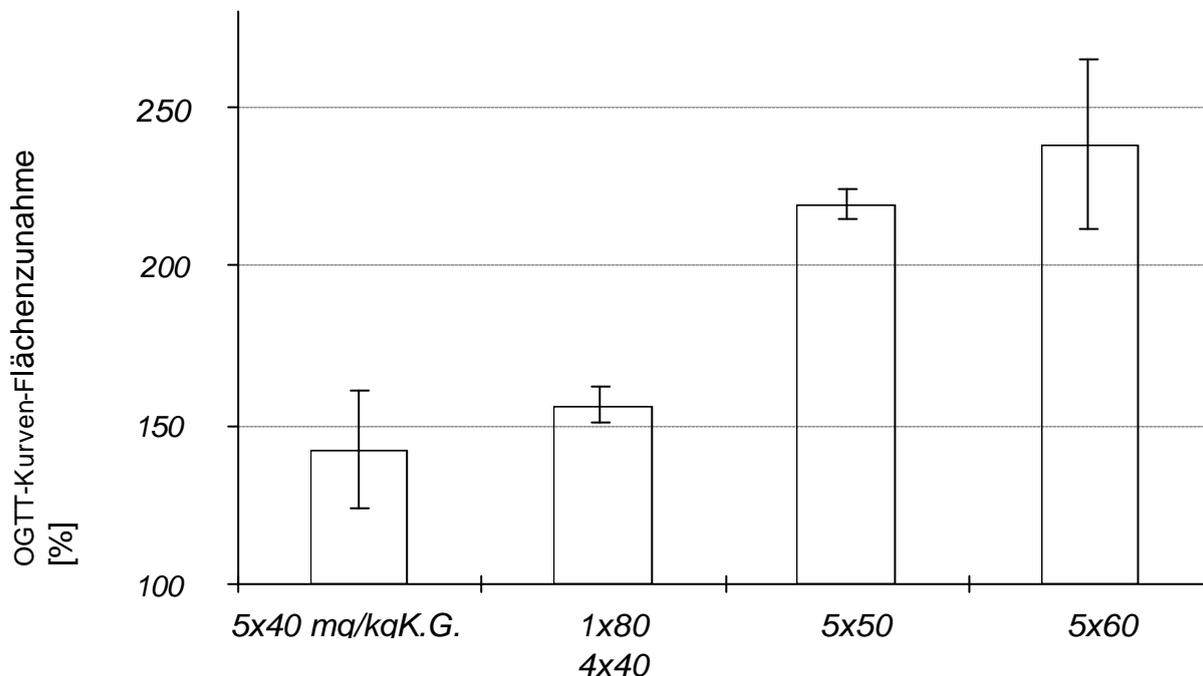


Abb.12: Beispiel für den unterschiedlichen Verlauf der OGTT-Blutglukosekurve vor (grau) und 70 Tage nach (schraffiert) Beginn der STZ-Behandlung (5x40 mg/kg K.G.) bei einer CD4/DR17-Maus

Um die individuellen Zunahmen der Kurvenfläche der Versuchstiere zu errechnen und die Tiere einer Behandlungsgruppe zusammenfassen zu können, wurde der Flächenwert unterhalb der Blutglukosekurve nach STZ-Behandlung durch den Flächenwert der Kurve vor STZ-Behandlung dividiert und der erhaltene Wert mit 100 multipliziert. Dadurch erhält man die prozentuale Zunahme bzw. Abnahme der Flächen unterhalb der Blutglukosekurve nach STZ-Behandlung. Es ergeben sich bei einer Flächenzunahme Werte, die über 100 liegen, und Werte unter 100, wenn die zweite Fläche kleiner geworden ist. Die Analyse zeigt, dass die Fläche unterhalb der Blutglukosekurve des OGTT mit Erhöhung der STZ-Dosis zunimmt und somit die Glukosetoleranz sinkt (Abb.13).

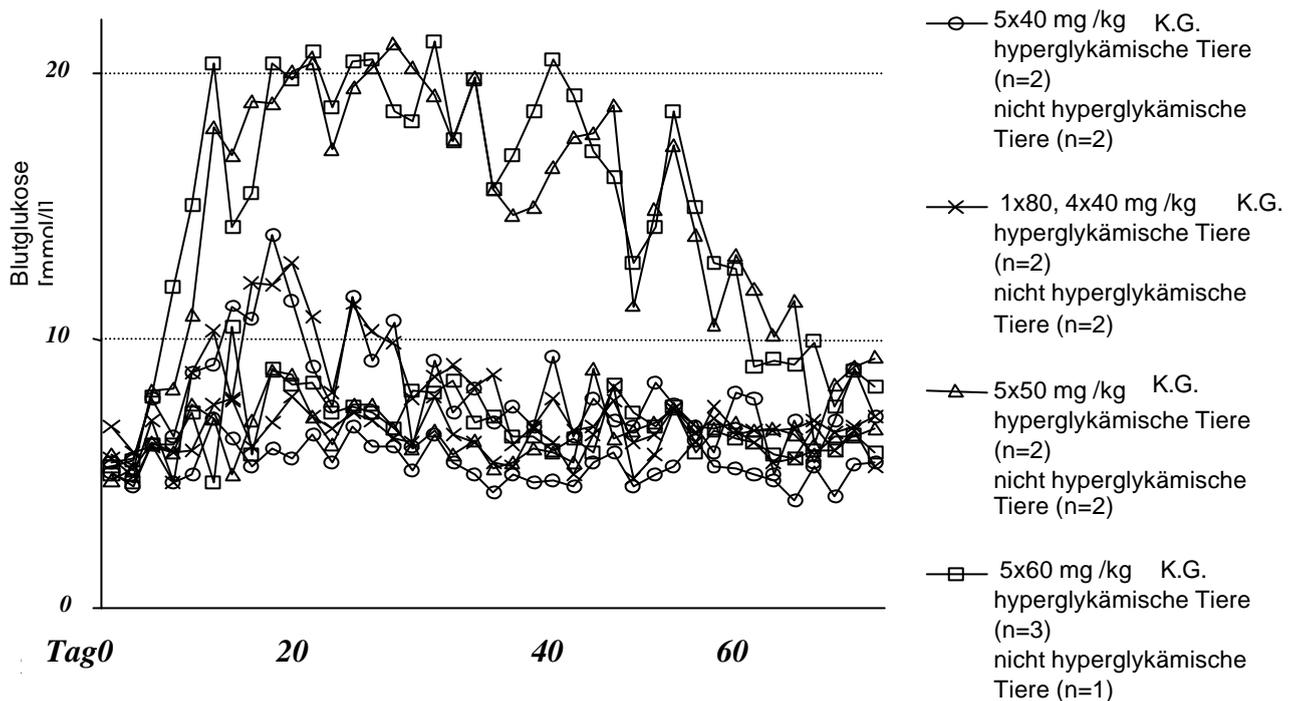


**Abb.13: Prozentuale Zunahme der Flächen unterhalb der OGTT-Blutglukosekurve von CD4/DR17-Mäusen am Tag 70 nach Beginn der Behandlung mit unterschiedlichen Mengen an STZ**

**4.2.3. Das Auftreten von Hyperglykämie in der CD4/DR17-Maus nach der Verabreichung unterschiedlicher Mengen STZ**

Hyperglykämie wurde als ein auftretender Blutglukosewert von mindestens 9,5 mmol/l definiert (siehe 4.1.1.). Im vorliegenden Experiment entwickelten nicht alle STZ-behandelten CD4/DR17-Mäuse eine Hyperglykämie. Auftretende Hyperglykämien verliefen nicht irreversibel, sondern waren in einem Zeitraum von 70 Tagen transient (4.2.1.). Obwohl die Inzidenz des Diabetes in der Kurvenhöhe der Darstellung der mittleren Blutglukosewerte zum Ausdruck kommt (Abb.11), läßt sich aus dieser Kurve kein direkter Rückschluß auf den

Blutglukoseverlauf einzelner hyperglykämischer oder nicht-hyperglykämischer Tiere ziehen. Bei Berücksichtigung des Auftretens der Hyperglykämie zeigt sich vielmehr, dass die Entwicklung der hyperglykämischen Blutglukosewerte unterschiedlich ist (Abb.14): Der Verlauf in den Gruppen 5x50 mg/kg K.G. und 6x50 mg/kg K.G. unterscheidet sich im Grad der Hyperglykämie von dem der Behandlungsgruppen 5x40 mg/kg K.G. und 1x80 + 4x40 mg/kg K.G.. Die Verläufe der Blutglukosewerte der Tiere, die keine Hyperglykämie entwickeln, sind in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen dagegen nahezu identisch.



**Abb.14: Darstellung des Verlaufes der mittleren Blutglukosewerte (Messungen im Abstand von jeweils zwei Tagen) solcher mit unterschiedlichen STZ-Dosen behandelter CD4/DR17-Mäuse, die eine Hyperglykämie entwickelten, und solcher Mäuse der jeweiligen Behandlungsgruppen, die keine Hyperglykämie entwickelten**

### 4.3. Induktion eines Diabetes in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten

In den folgenden Experimenten wurden CD4/DR17-Mäuse und Segreganten (3.1.2.), denen eines oder beide Transgene fehlen, sowie CD4-defiziente Mäusen eingesetzt, um die Bedeutung der Transgene in der Pathogenese des STZ-Diabetes der CD4/DR17-Maus zu untersuchen. Hyperglykämie (4.3.1.; 4.3.2.1.), Verminderung der Glukosetoleranz (4.3.2.2.), Abnahme des Insulingehalts (4.3.2.3.) und das Auftreten von Insulitiden (4.3.2.4.) nach STZ-Behandlung wurden erfaßt und die unterschiedlichen Tiergruppen miteinander verglichen. In den Ansätzen sind zwei unterschiedliche STZ-Dosierungen eingesetzt worden. Im Abschnitt 4.3.1. sind die Tiere mit 5x40 mg/kg K.G., im Abschnitt 4.3.2. mit 1x80+4x40 mg/kg K.G. STZ behandelt worden.

Die Analysen zeigen, dass Hyperglykämie und die Häufigkeit von Insulitiden des Grades II in CD4/DR17-Mäusen gegenüber Segreganten erhöht ist.

**4.3.1. Vergleich der Blutglukoseverläufe zwischen CD4/DR17-Mäusen und transgenen Segreganten nach Behandlung mit 5x40 mg/kg K.G. STZ**

a) Den Mäusen der folgenden zwei Gruppen wurden 5x40 mg/kg K.G. STZ i.p. injiziert:

CD4/DR17 (n=4)

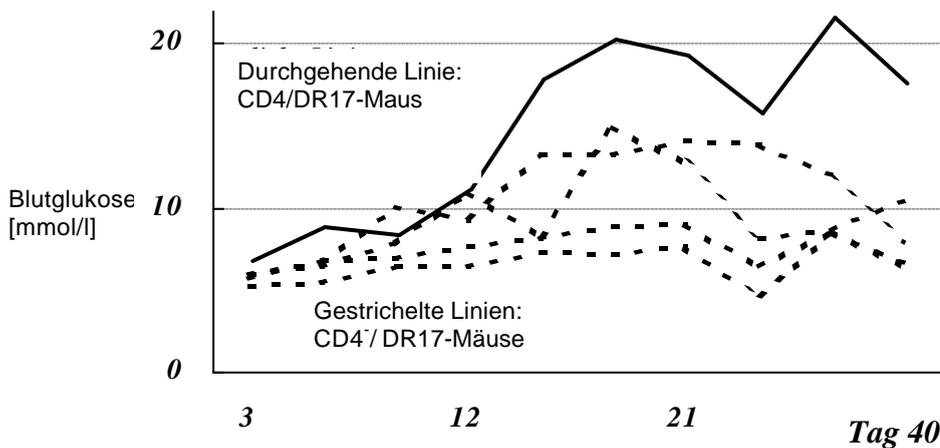
CD4<sup>-</sup>/DR17 (n=4)

Die Blutglukose wurde bis zum Tag 40 bestimmt.

Im Experiment entwickelten CD4/DR17-Mäuse eine stärkere Hyperglykämie als Segreganten ohne CD4-Molekül (CD4<sup>-</sup>/DR17-Mäuse).

In allen behandelten CD4/DR17-Mäusen trat eine Hyperglykämie auf. In drei der vier Mäuse traten Blutglukosewerte über 20 mmol/l auf. Der höchste gemessene Blutglukosewert betrug in dieser Gruppe 31,7 mmol/l.

In zwei von vier CD4<sup>-</sup>/DR17-Mäusen trat eine Hyperglykämie auf. Der höchste gemessene Blutglukosewert dieser Gruppe betrug 14,1 mmol/l.



**Abb.15: Blutglukoseverläufe von CD4/DR17-Mäusen (Mittelwerte von 4 Tieren) und von vier CD4<sup>-</sup>/DR17-Mäusen nach MLD-STZ-Behandlung**

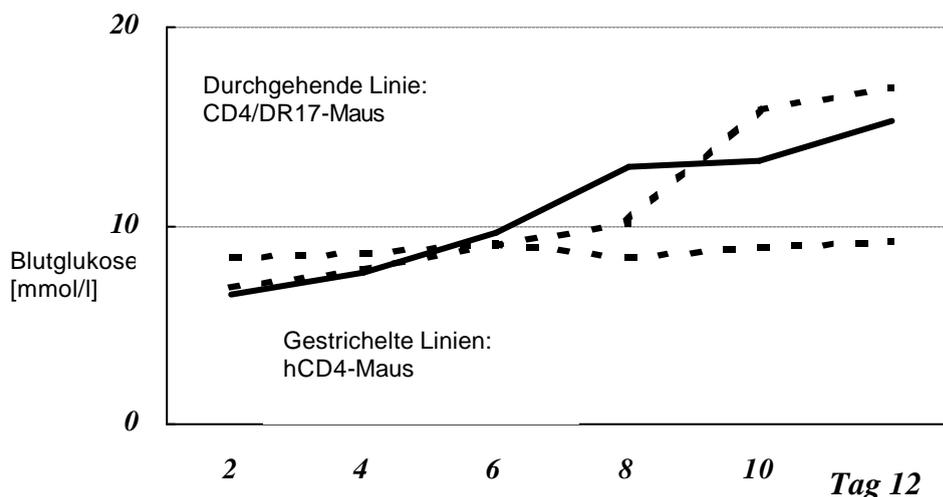
b) Den Mäusen der folgenden zwei Gruppen wurden 5x40 mg/kg STZ i.p. injiziert:

CD4/DR17 (n=4)

hCD4 (n=4)

Die Blutglukose wurde bis zum Tag 12 bestimmt.

In CD4/DR17-Mäusen entwickelt sich häufiger eine Hyperglykämie als in Segreganten, die humanes CD4 exprimieren, denen aber das DR17-Molekül fehlt (hCD4-Mäuse). In allen vier CD4/DR17-Mäusen und in zwei der vier hCD4-Mäusen trat eine ansteigende Hyperglykämie bis zum Tag 12 auf. In zwei der vier hCD4 Mäusen trat nur eine transiente, eintägige Hyperglykämie am Tag 6 auf.



**Abb.16: Blutglukoseverläufe von MLD-STZ-behandelten CD4/DR17- (Mittelwerte von 4 Mäuse) und von hCD4-Mäusen (Mittelwerte von jeweils 2 Mäusen mit ähnlichen Blutglukoseverläufen)**

#### **4.3.2. Vergleich der Diabetesentwicklung zwischen CD4/DR17-Mäusen und transgenen Segreganten nach Behandlung mit 1x80 und 4x40 mg/kg STZ**

Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche (A und B) durchgeführt:

A) Sechs CD4<sup>-</sup>-Mäuse sowie jeweils 7 Mäuse der Gruppen CD4/DR17, CD4<sup>-</sup>/DR17, wurden 1x80 und 4x40 mg/kg STZ i.p. injiziert.

B) Jeweils 12 Mäusen der folgenden Gruppen wurden 1x80 und 4x40 mg/kg STZ i.p. injiziert: CD4/DR17, CD4<sup>-</sup>/DR17 und hCD4.

Die tägliche Blutglukose (4.2.2.1.) sowie der OGTT vor der STZ-Behandlung und am Tag 37 (Versuch A) bzw. 38 (Versuch B) nach Beginn der STZ-Behandlung (4.2.2.2.) wurden bestimmt. Die Tiere wurden am Tag 40 getötet. Immunhistochemisch wurde die Einwanderung von CD4<sup>+</sup> Zellen dargestellt (4.2.2.5.) und der prozentuale Insulingehalt in Inseln des Pankreas (4.2.2.3.) ermittelt sowie eine Graduierung der Insulitiden (4.2.2.4.) vorgenommen.

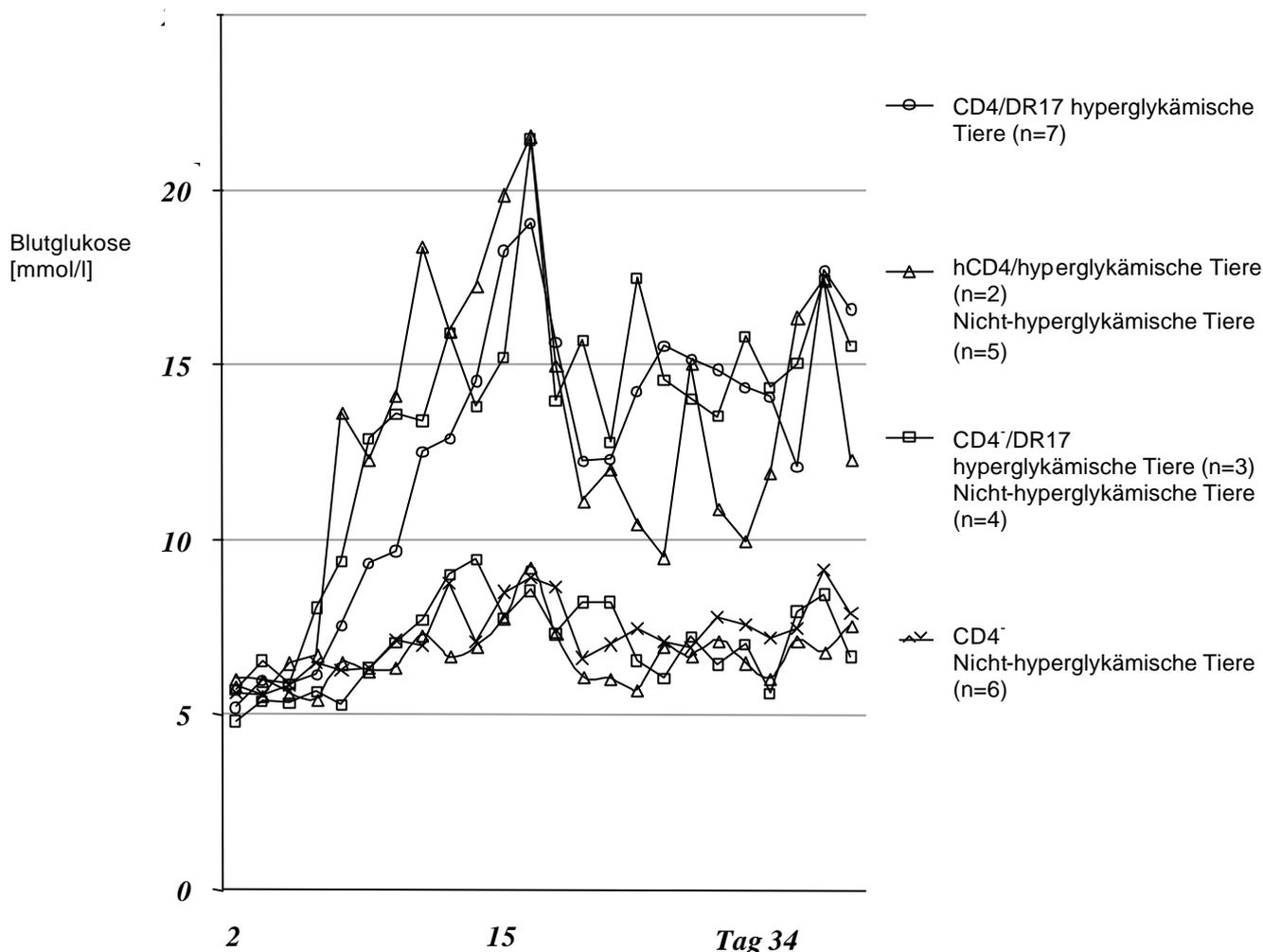
*4.3.2.1. Verlauf der Blutglukose nach STZ-Behandlung in der CD4/DR 17-Maus und transgenen Segreganten*

A) In der Gruppe der CD4/DR17-Mäuse wurden alle 7 Tiere über einen längeren Verlauf hyperglykämisch. Demgegenüber entwickelten transgene Segreganten seltener (CD4<sup>-</sup>/DR17- und hCD4-Mäuse) oder nie (CD4<sup>-</sup>-Mäuse) eine mehrtägige Hyperglykämie (siehe Tabelle 7).

Tiergruppe	Entwicklung einer andauernden Hyperglykämie	Keine Entwicklung einer länger als 4 Tage andauernden Hyperglykämie
CD4/DR17	7	0
hCD4	2	5
CD4 <sup>-</sup> /DR17	3	4
CD4 <sup>-</sup>	0	6

**Tabelle 7: CD4/DR17-Mäuse und Segreganten (Tierzahlen), die nach STZ-Behandlung eine andauernde bzw. keine über 4 Tage dauernde Hyperglykämie entwickelten**

Vergleicht man den Verlauf der mittleren Blutglukosespiegel der Tiere aus den verschiedenen Gruppen, stellt man fest, dass sich zwar die Häufigkeit im Auftreten von Hyperglykämien bei den unterschiedlichen Gruppen unterscheidet, die hyperglykämischen und nicht-hyperglykämischen Blutglukoseverläufe bei den unterschiedlichen Tiergruppen jedoch sehr ähnlich sind (siehe Abb.17 auf der folgenden Seite).

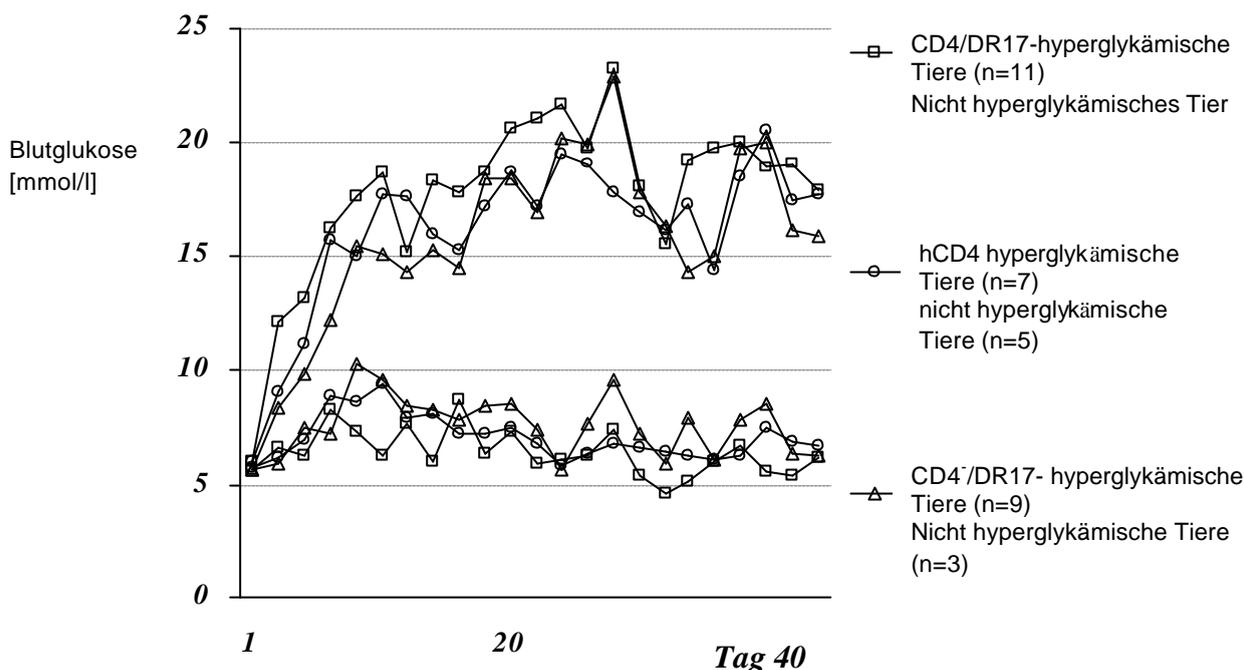


**Abb.17: Blutglukoseverläufe (Mittelwerte) der dauerhaft hyperglykämischen Tieren einzelner Behandlungsgruppen und der Tiere, die nicht über einen Zeitraum von mehr als vier aufeinanderfolgenden Tagen hyperglykämisch wurden**

B) In der Gruppe der CD4/DR17-Mäuse wurden 11 von 12 Mäusen über einen längeren Zeitraum hyperglykämisch. In der Gruppe der CD4<sup>-</sup>/DR17-Mäuse bekamen 9 der 12 Mäuse eine langanhaltende Hyperglykämie. In der Gruppe der hCD4-Mäuse entwickelten 7 von 12 Mäusen eine anhaltende Hyperglykämie.

Tiergruppe	Entwicklung einer andauernden Hyperglykämie	Keine Entwicklung einer länger als 4 Tage andauernden Hyperglykämie
CD4/DR17	11	1
hCD4	7	5
CD4 <sup>-</sup> /DR17	9	3

**Tabelle 8: CD4/DR17-Mäuse und Segreganten (Tierzahlen), die in einem Experiment nach STZ-Behandlung eine andauernde bzw. keine über 4 Tage dauernde Hyperglykämie entwickeln**



**Abb.18: Mittelwerte der Blutglukosewerte STZ-behandelter CD4/DR17-, hCD4- und CD4<sup>-</sup>/DR17-Mäuse**

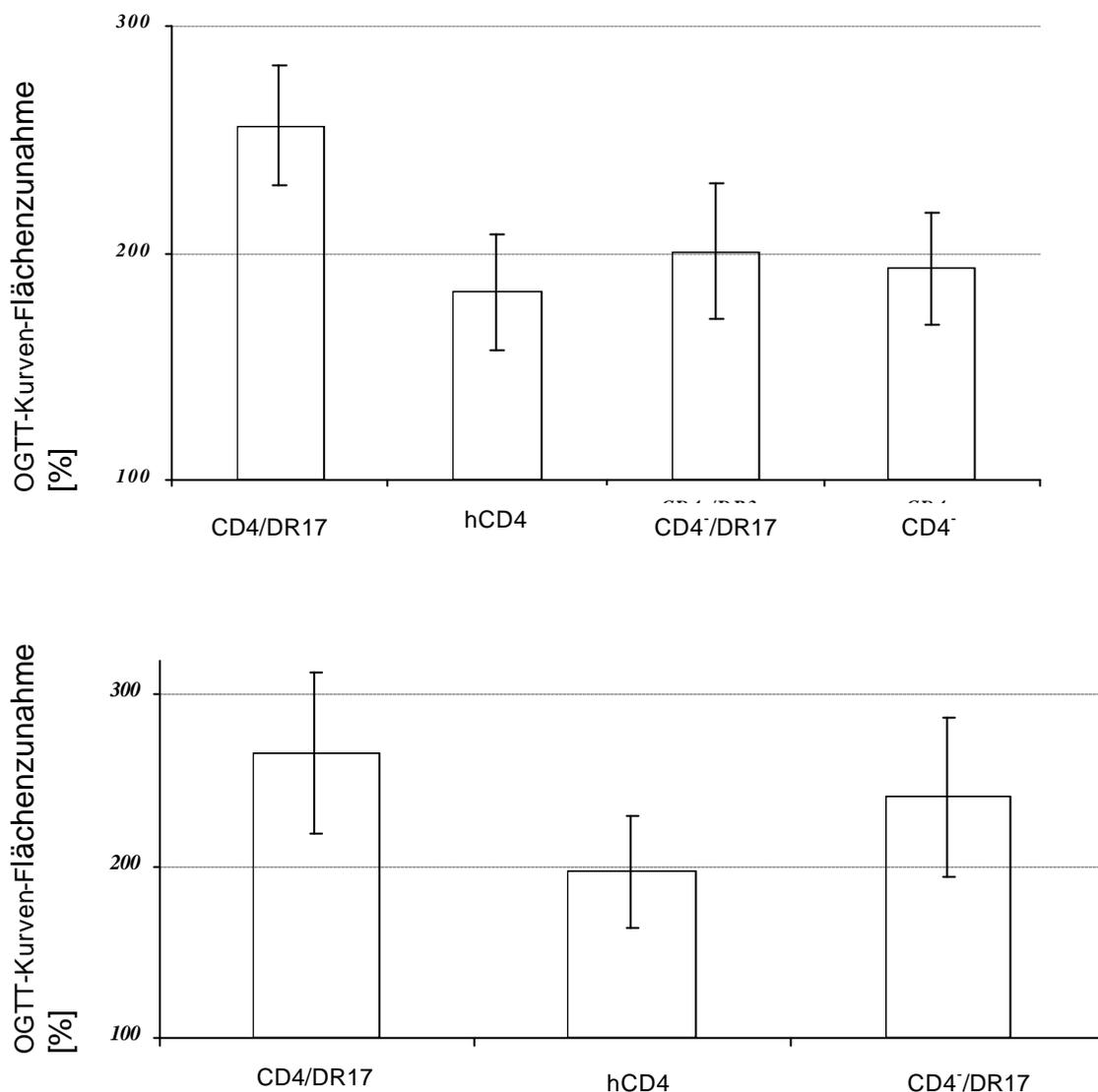
Ebenso wie im Versuch A, ähneln sich im Versuch B die mittleren Blutglukoseverläufe der Tiere aus den unterschiedlichen Gruppen, wohingegen sich die Tiergruppen in der Häufigkeit des Auftretens von Hyperglykämien unterscheiden (siehe Abb.18).

Werden die Ergebnisse aus den Versuchen A und B zusammengefaßt, ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede in der Entwicklung einer länger als vier Tage dauernden Hyperglykämie zwischen CD4/DR17-Mäusen und den transgenen Segreganten hCD4, CD4<sup>-</sup>/DR17 und CD4<sup>-</sup> (Siehe Tabelle 9)

Tiergruppe	Tierzahl Entwicklung andauernden Hyperglykämie	mit einer	Keine Entwicklung einer länger als 4 Tage andauernden Hyperglykämie	Statistische Analyse mit Fishers exaktem Test
CD4/DR17	18	1		Vergleichsgruppe
hCD4	9	10		Signifikant (p≤0,05)
CD4 <sup>-</sup> /DR17	12	7		signifikant
CD4 <sup>-</sup>	0	6		signifikant

**Tabelle 9: /DR17-Mäusen und Segreganten (Tierzahlen) aus zwei Experimenten, die nach STZ-Behandlung eine andauernde bzw. keine über 4 Tage dauernde Hyperglykämie entwickeln, sowie die Resultate der statistischen Analyse**

4.3.2.2. Auswirkungen der STZ-Behandlung in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten auf die orale Glukosetoleranz



**Abb.19+20: Darstellungen der Mittelwerte der relativen Zunahmen der Flächen (%) unterhalb der BG-Kurven des OGTT am Tag 37 (Versuch A; Abb.18, oben) bzw. am Tag 38 (Versuch B; Abb.19, unten) nach Beginn der STZ-Behandlung**

Die Glukosetoleranz sinkt in allen STZ-behandelten Tieren der unterschiedlichen Gruppen, was sich in einer Verdopplung der Fläche der Blutglukosekurve ausdrückt (Zunahme auf ≈200%). Die Flächenzunahme ist am stärksten in der Gruppe der STZ-behandelten CD4/DR17-Mäuse und am schwächsten in der Gruppe der STZ-behandelten hCD4-Mäuse (siehe Abb.19 und 20).

4.3.2.3. *Auswirkungen der STZ-Behandlung in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten auf den Anteil insulinhaltiger Zellen in Pankreasinseln*

Der prozentuale Insulingehalt in Inseln aus Mäusen der unterschiedlichen Gruppen (Mittelwerte) ist in folgender Tabelle dargestellt:

Tiergruppe (in Klammern Tierzahl)	Mittelwerte der Versuche A und B (in Klammern Standardabweichung)
CD4/DR17 (19)	18% (12)
hCD4 (19)	28% (20)
CD4 <sup>-</sup> /DR17 (19)	19% (8)
CD4 <sup>-</sup> (6)	34% (22)
Unbehandelte CD4/DR17-Mäuse (4 )	65% (26)

**Tabelle 11: Anteile der insulinhaltigen Fläche (%) in den Inseln aus STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen und Segreganten aus zwei Experimenten sowie aus vier unbehandelten CD4/DR17-Mäusen**

Der Insulingehalt der Inseln STZ-behandelter Tiere ist in allen Gruppen vermindert. CD4/DR17-Mäuse, die Tiergruppe mit der stärksten Inzidenz einer Hyperglykämie, zeigen auch den geringsten Insulingehalt der Pankreasinseln.

Neben Inseln mit einem geringen Insulinanteil treten in den Inseln aller untersuchten Mäuse auch solche mit einem nach wie vor hohen Insulingehalt auf.

4.3.2.4. *Auftreten von Insulitiden in der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten nach STZ-Behandlung*

In der folgenden Tabelle sind die Entzündungen in Inseln aus Mäusen der unterschiedlichen Gruppen nach Graden eingeteilt:

Tiergruppe	Anzahl bewerteter Inseln	Erscheinungsbild der Inseln		
		Keine Infiltrationen	Insulitisgrad	
Versuch A		0	I	II
CD4/DR17	105	54	20	31
hCD4	75	59	7	9
CD4 <sup>-</sup> /DR17	83	64	12	7
CD4 <sup>-</sup>	55	52	3	1

Versuch B				
CD4/DR17	110	68	19	23
hCD4	97	50	12	16
CD4 <sup>-</sup> /DR17	63	39	16	8

**Tabelle 12: Inseln mit Insulitiden der Grade 0-II aus STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen und Segreganten aus zwei Experimenten (A und B)**

Insulitiden des Grades II treten in transgenen Segreganten weniger häufig auf. In Inseln von CD4<sup>-</sup>-Mäusen, die weder CD4 noch DR17 exprimieren, sind am seltensten Infiltrationen zu sehen (siehe Tabelle 12).

Die Versuche A und B sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tiergruppe	Ohne Insulitis	Insulitis Grad I	Insulitis Grad II
CD4/DR17	57%	18%	25%
hCD4	75%	13%	12%
CD4 <sup>-</sup> /DR17	71%	19%	10%
CD4 <sup>-</sup>	93%	5%	2%

**Tabelle 13: Prozentuale Anteile der Inseln mit Insulitiden der Grade 0-II aus STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen und Segreganten aus den Experimenten A und B**

In CD4/DR17-Mäusen treten demnach am Tag 40 nach STZ-Behandlung mehr Insulitiden auf als in transgenen Segreganten. Insgesamt erscheinen in mehr als 40% der Inseln der CD4/DR17-Mäuse Insulitiden. Bei diesen Insulitiden handelt es sich häufiger um schwere Insulitiden des Grades II. In transgenen Segreganten überwiegen dagegen Insulitiden des Grades I. Mehr als 70% der Inseln weisen bei den Segreganten keine Infiltrationen auf. In CD4<sup>-</sup>-Mäuse sind sogar über 90% der Inseln ohne Infiltrationen (siehe Tabelle 13).

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 14), in denen nur solche Tiere in der Bewertung der Insulitis berücksichtigt worden sind, die eine Hyperglykämie entwickelten, bleiben die Unterschiede im Auftreten der Insulitiden zwischen den Tiergruppen erhalten:

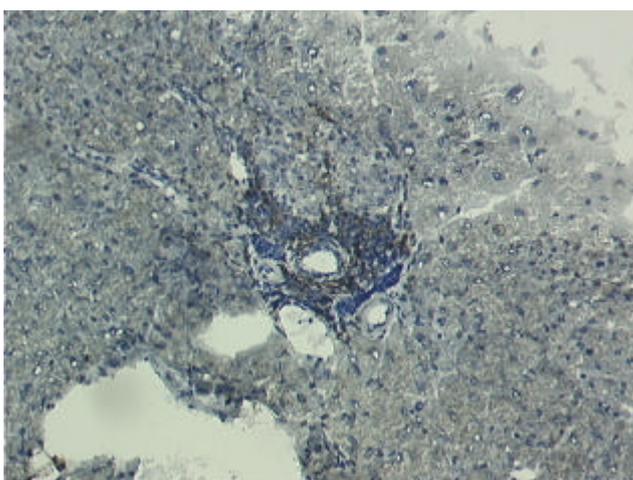
Versuch A+B, Nur Tiere, welche eine Hyperglykämieentwickelten, die über 4 Tage dauerte (vgl. 4.2.1.3.1)	Erscheinungsbild der Inseln		
	Ohne Insulitis	Insulitisgrad	
		0	I
CD4/DR17	57%	18%	25%
hCD4	61%	21%	16%
CD4 <sup>-</sup> /DR17	72%	21%	7%

**Tabelle 14: Prozentuale Anteile der Inseln mit Insulitiden der Grade 0, I oder II aus STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen und Segreganten aus zwei unterschiedlichen Experimenten, welche eine über 4 Tage andauernde Hyperglykämie entwickelten**

4.3.2.5. Immunhistochemischer Nachweis von eingewanderten CD4<sup>+</sup> Zellen in Inseln bzw. Inselnähe.

Es sollte untersucht werden, ob bei Tieren, die transgenes humanes CD4 exprimieren, CD4<sup>+</sup> Zellen in den Insulitiden auftreten und ob dieses Auftreten von der transgenen Expression eines humanen MHC-Klasse II-Moleküls abhängt.

In Kryostatschnitten des Pankreas von CD4/DR17-Mäuse und hCD4-Mäusen am Tag 40 nach der Behandlung mit 1x80 und 4x40 mg/kg konnten in Insulitiden und Periinsulitiden immunhistochemisch CD4<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (es erfolgte keine Quantifizierung).



**Abb.21: Immunhistochemisch dargestellte CD4<sup>+</sup> Zellen (braungefärbt) in der Insulitis einer hCD4-Maus (DAB Färbung, Hämatoxylin-Gegenfärbung)**

#### **4.4. Einfluß der Verabreichung von Antikörpern, die gegen das hCD4- bzw. CD8-Molekül gerichtet sind, auf den Verlauf eines MLD-STZ-induzierten Diabetes in der CD4/DR17-Maus**

Die Ausschaltung von potentiell pathogenen CD4<sup>+</sup> Zellen ist ein möglicher therapeutischer Ansatz, um das Autoimmungeschehen des Typ 1 Diabetes zu stoppen. Der Einsatz von anti-CD4-mAk in humanisierten Tiermodellen stellt eine Möglichkeit dar, die Wirksamkeit solcher Antikörper präklinisch zu testen. Im vorliegenden Experiment wurden unterschiedliche nicht-depletierende Antikörper, die gegen das humane CD4-Molekül (MAX12F6 und MAX16H5) gerichtet sind, sowie ein depletierender anti-(mur) CD8-mAk (53.6.72) auf ihre Wirkung auf den Verlauf des STZ-Diabetes in der CD4/DR17-Maus getestet. Als Kontrollantikörper diente der monoklonale Mausantikörper des Klons MOPC 21 mit unbekannter Spezifität.

Sämtliche Mäuse wurden mit 5x40 mg/kg K.G. STZ behandelt. Die Antikörperbehandlung begann am Tag drei der STZ-Verabreichung und wurde täglich an den zwei darauffolgenden Tagen fortgesetzt. Die weitere Behandlung bis zum Tag 25 erfolgte in dreitägigem Abstand. Jede Maus erhielt somit insgesamt zehn Injektionen der Antikörperlösung.

Die Antikörperbehandlungen riefen Teildepletionen innerhalb der Lymphozytenpopulationen hervor, die noch am Tag 45 durch FACS-Analyse des peripheren Blutes und am Tag 48 in der Milz meßbar waren (4.4.5.), und beeinflussten den klinischen Verlauf des STZ-Diabetes (4.4.1.-4.4.2.) sowie das Auftreten von schweren Insulitiden (4.4.4.). Die anti-CD8-Ak-Behandlung vermochte es, den STZ-Diabetes wirksamer zu unterdrücken als die Behandlung mit dem anti-CD4-mAk MAX16H5, während die Behandlung mit MAX12F6 den Krankheitsverlauf nicht abmilderte, sondern verstärkte.

##### ***4.4.1. Verlauf der Blutglukosewerte in STZ- und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen***

Sämtliche STZ-behandelten Tiere wurden hyperglykämisch. Es kann ein stark hyperglykämischer Verlauf und ein weniger starker hyperglykämischer sowie ein weniger starker, transienter hyperglykämischer Verlauf differenziert werden.

Beim starken Verlauf traten Werte über 20 mmol/l auf, die bis zum Tag 40 nicht zurückgingen. Der weniger starke Verlauf zeigte Werte unter 20 mmol/l, bei ebenfalls bestehender Hyperglykämie am Tag 40. Der transiente Verlauf wies BGs unter 15 mmol/l auf; am Tag 40 lagen keine Hyperglykämien mehr vor.

Die unterschiedlichen Verläufe sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

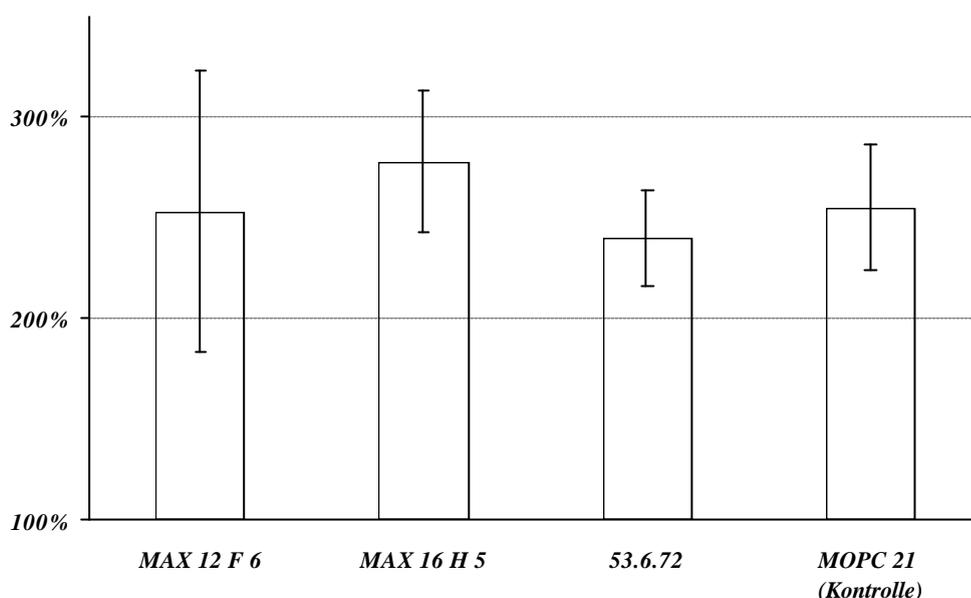
Behandlung Mit folgendem Antikörper:	Starke Hyperglykämie	keine starke Hyperglykämie		Statistische Analyse mit Fishers exaktem Test (signifikant bei P=0,05)
		Hyperglykämie	Transiente Hyperglykämie	
MAX12F6	4			Signifikant gegenüber 53.6.72-behandelten Mäusen
MAX16H5	2		2	Keine signifikanten Unterschiede innerhalb dieser Gruppen
53.6.72		2	2	
MOPC21	3		1	

**Tabelle 15: CD4/DR17-Mäuse (Tierzahlen), denen an den Tagen 35 nach Beginn der STZ-Behandlung und in dreitägigem Abstand bis zum Tag 25 unterschiedliche monoklonaler Antikörper gegen hCD4 (MAX12F6 oder MAX16H5) oder CD8 (53.6.72) oder gegen ein unbekanntes Epitop (MOPC21) verabreicht wurden und eine starke Hyperglykämie (<20 mmol/l), eine schwächere andauernde (bis Tag 40 bestehend) oder eine transiente Hyperglykämie entwickelten**

Möglicherweise aufgrund der geringen Gruppengrößen sind die bestehenden Unterschiede statistisch nicht signifikant gegenüber der MOPC21-behandelten Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch zwischen den Blutglukoseverläufen der MAX12F6- und der 53.6.72-behandelten Mäuse: Von den vier 53.6.72-behandelten Mäusen zeigte keine einen stark hyperglykämischen Verlauf. Dagegen zeigten alle vier mit MAX12F6-behandelten Mäuse einen stark hyperglykämischen Verlauf.

**4.4.2. Der Orale Glukose-Toleranz-Test bei STZ-und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen**

Sämtliche STZ-behandelten Tiere weisen am Tag 36 nach Beginn der STZ-Behandlung eine deutliche Zunahme der Fläche unter der Blutglukosekurve auf. Die geringste Zunahme ist in der mit dem anti-CD8-mAk 53.6.72 behandelten Gruppe zu sehen. Die höchste Zunahme findet in der Gruppe der mit dem anti-CD4-mAk MAX16H5 behandelten Tiere statt (siehe Abb.22 auf der nachfolgenden Seite).



**Abb.22:** Flächenzunahme der Blutglukosekurven des OGTT am Tag 36 nach Beginn der MLD-STZ-Behandlung bei CD4/DR17-Mäusen, denen an den Tagen 3-5 nach Beginn der STZ-Behandlung und in dreitägigem Abstand bis zum Tag 25 unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen das hCD4- (MAX12F6 oder MAX16H5) oder gegen das CD8-Molekül (53.6.72) oder gegen ein unbekanntes Epitop (MOPC21) verabreicht wurden

**4.4.3. Bestimmung des Insulingehaltes in den Inseln von STZ-und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen**

Tiergruppe	Mittelwerte (in Klammern Standardabweichung)
MAX12F6	19% (20)
MAX16H5	31% (17)
53.6.72	24% (12)
MOPC21 (Kontrolle)	19% (8)
CD4/DR17-Mäuse ohne STZ-Behandlung	65% (26)

**Tabelle 16:** Mittelwerte der prozentualen Anteile der insulinhaltigen Fläche in Inseln von jeweils 4 CD4/DR17-Mäusen, denen an den Tagen 3-5 nach Beginn der STZ-Behandlung und in dreitägigem Abstand bis zum Tag 25 unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen das hCD4- (MAX12F6 oder MAX16H5) oder gegen das CD8-Molekül (53.6.72) oder gegen ein unbekanntes Epitop (MOPC21) verabreicht wurden

Wie in vorherigen Experimenten (4.3.2.3.) ließen sich in Präparaten der STZ-behandelten Gruppe neben Inseln mit fast vollständigem Insulinverlust ebenso Inseln mit einem hohen Insulingehalt darstellen. Gegenüber Präparaten aus unbehandelten Mäusen zeigte sich in Inseln sämtlicher STZ-behandelter Mäuse ein deutlicher Verlust an Insulin.

**4.4.4. Das Auftreten von Insulitiden in STZ-und Antikörper-behandelten CD4/DR17-Mäusen**

In MAX16H5-behandelten Mäusen nimmt die Zahl an Insulitiden des Grades II leicht ab. Ein starker Rückgang ist hingegen bei anti-CD8 (53.6.72)-behandelten Tieren zu sehen, wohingegen MAX12F6-behandelte Tiere häufiger schwere Insulitiden des Grades II als MOPC21 (Kontrollantikörper)-behandelte Tiere aufweisen.

Die Zahlen der beurteilten Inseln sind in Tabelle 17 dargestellt:

Tiergruppe	Gezählte Inseln		
	Keine Infiltrationen	Insulitisgrad	
		0	I
MAX 12 F 6	20	8	17
MAX 16 H 5	42	13	15
53.6.72	38	5	6
MOPC 21	34	6	9

**Tabelle 17: Inseln mit Insulitiden der Grade 0, I oder II aus jeweils 4 STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen, denen am Tag 3-5 nach Beginn der MLD-STZ-Behandlung sowie in dreitägigem Abstand bis zum Tag 25, unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen das hCD4-Molekül (MAX12F6 oder MAX16H5), das CD8-Molekül (53.6.72) oder gegen ein unbekanntes Epitop (MOPC21) verabreicht wurden**

Die Darstellung des prozentualen Anteils von infiltrierte Inseln an der Gesamtzahl untersuchter Inseln erfolgt in Tabelle 18. Demnach sind in den mit MAX12F6-behandelten CD4/DR17-Mäusen mehr als die Hälfte aller Inseln infiltrierte. Insulitiden des Grades II kommen etwa doppelt so häufig vor, wie Insulitiden des Grades I. Bei MOPC21 und MAX16H5-behandelten Mäusen sind dagegen weniger als die Hälfte der Inseln infiltrierte; die Infiltrate des Grades II überwiegen, wenn auch nicht so deutlich wie bei der MAX12F6-behandelten Gruppe. MAX16H5-behandelte Mäuse weisen weniger Infiltrationen als MOPC21-behandelte Mäuse auf. Deutlich weniger Infiltrationen, nämlich lediglich in etwa einem Fünftel der Inseln, konnten in 53.6.72-behandelten Mäusen detektiert werden. Hier waren Infiltrate der Grade I und II in nahezu gleicher Häufigkeit zu sehen.

Tiergruppe	Keine Infiltrationen	Insulitisgrad	
	0	I	II
MAX12F6	44%	18%	38%
MOPC21	56%	18%	26%
MAX16H5	61%	19%	21%
53.6.72	78%	10%	12%

**Tabelle 18: Prozentuale Anteile der unterschiedlich stark (Grad 0-II) infiltrierten Inseln an der Gesamtzahl der untersuchten Inseln aus jeweils 4 STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen, denen am Tag 3-5 nach Beginn MLD-STZ-Behandlung sowie in dreitägigem Abstand bis zum Tag 25 unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen hCD4-Molekül (MAX 12 F 6 oder MAX 16 H 5), das CD8-Molekül (53.6.72) oder gegen ein unbekanntes Epitop (MOPC 21) verabreicht wurden**

**4.4.5. Durchflußzytometrische Analyse des Blutes und der Milzen STZ-und Antikörper-behandelter CD4/DR17-Mäuse**

Mittels FACS-Analyse (3.2.7.) konnte eine durch die jeweilige Antikörperbehandlung verursachte Depletion oder Teildepletion von T-Zellpopulationen festgestellt werden.

Die FACS-Analysen des peripheren Blutes fanden an den Tagen 7, 14, 48 und 45 nach Beginn der STZ-Behandlung statt. Es wurden CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen mit fluoreszenzmarkierten mAk dargestellt. Am Ende des Experimentes, am Tag 48, wurden aus den Milzen der Tiere Einzelzellsuspensionen hergestellt und diese ebenfalls auf CD4, CD8 und CD3-Marker durchflußzytometrisch untersucht (3.2.7.2.); dabei dienten zwei gänzlich unbehandelte CD4/DR17-Mäuse als zusätzliche Kontrollgruppe.

Die Zellzahlen wurden mittels Quadrantenanalyse ermittelt. Die Zahlenwerte stellen den prozentualen Anteil dieser Zellpopulation an der Gesamt-Lymphozytenpopulation dar. Bei anti-CD4-mAk-behandelten Mäusen wurden CD4-Zellen als CD8-negative, CD3<sup>+</sup> Zellen bestimmt. In anti-CD8-mAk-behandelten Mäusen wurden die CD8-Zellen als CD4-negative, CD3<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Durch dieses Vorgehen werden sonst mögliche Kompetitionen zwischen anti-CD4-Detektionsantikörper und MAX16H5- oder MAX12F6-mAk bzw. zwischen dem anti-CD8-Detektionsantikörper und dem 53.6.72-mAk vermieden.

**4.4.5.1. Durchflußzytometrische Analyse des Blutes STZ-und Antikörper-behandelter CD4/DR17-Mäuse**

Unter den Antikörperbehandlungen traten Teildepletionen innerhalb der CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Lymphozytenpopulationen auf. Veränderungen der Anteile dieser Lymphozytenpopulationen

war im Blut noch am Tag 45 nach STZ-Behandlungs-Beginn sichtbar (20 Tage nach der letzten Antikörperbehandlung).

Behandlungsgruppe	Vor Behandlungsbeginn		Tag 7		14		28		45	
	CD4 <sup>+</sup> %	CD8 <sup>+</sup> %	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
MAX 12 F 6	16,6 (3,9)	8,1 (1,9)	2,9 (1,9)	11,19 (3,2)	6,7 (1,1)	11,4 (5,3)	3,2 (1,2)	11,7 (3,4)	5,5 (1,6)	11,0 (3,8)
MAX 16 H 5	18,4 (3,0)	9,6 (2,6)	7,3 (3,9)	8,5 (2,8)	6,9 (2,5)	12,4 (1,7)	7,4 (1,1)	9,8 (1,8)	8,15 (4,0)	10,7 (2,2)
53.6.72	20,3 (1,5)	9,2 (1,4)	22,6 (1,5)	5,2 (0,6)	23,4 (1,4)	2,8 (0,6)	19,3 (3,0)	2,0 (0,5)	23,9 (5,9)	2,6 (1,0)
MOPC 21	17,2 (3,8)	11,4 (3,0)	18,9 (3,8)	9,9 (1,8)	19,2 (4,5)	12,6 (3,0)	16,3 (3,7)	13,3 (2,5)	16,3 (7,8)	11,3 (3,5)

+ = bzw. CD3<sup>+</sup> u. CD8<sup>-</sup>      \* = bzw. CD3<sup>+</sup> u. CD4<sup>-</sup>

**Tabelle 19:** Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten an der Lymphozytenpopulation zu unterschiedlichen Tagen nach Beginn der STZ-Behandlung (Tag 0) im Blut von je 4 CD4/DR17-Mäusen, denen am Tag 3-5 und desweiteren in dreitägigem Abstand bis zum Tag 25 unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen das hCD4-(MAX 12 F 6 oder MAX 16 H 5), das CD8-Molekül (53.6.72) oder gegen ein unbekanntes Epitop (MOPC 21) verabreicht wurden; Werte wurden mittels Quadrantenanalyse nach durchflußzytometrischer Messung ermittelt und stellen Mittelwerte dar (in Klammern Standardabweichung)

**4.4.5.2. Durchflußzytometrische Analyse der Milzen STZ-und Antikörper-behandelter CD4/DR17-Mäuse**

Die Analyse der Milzzellen am Tag 48 zeigt, dass Teildepletionen nach wie vor detektierbar sind; sie ist in folgender Tabelle dargestellt:

	CD4 [%]	CD8 [%]	CD3 [%]
MAX 12 F 6	10 (1,7)	14 (3,3)	23 (4,9)
MAX 16 H 5	11 (1,6)	16 (2,4)	28 (6,2)
53.6.72	22 (2,5)	4 (0,9)	28 (6,2)
MOPC 21	17 (4,3)	16 (3,2)	33 (7,6)
Kontrolltiere (n=2)	23 (2,5)	18 (7,5)	41 (9,5)

**Tabelle 20:** Anteile der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenpopulation von Milzzellensuspensionen vom Tag 48 nach Beginn der MLD-STZ-Behandlung (Tag 0) von jeweils 4 CD4/DR17-Mäusen, denen am Tag 3-5 und desweiteren in dreitägigem Abstand bis zum Tag 25 unterschiedliche monoklonale Antikörper gegen das hCD4- (MAX 12 F 6 oder MAX 16 H 5), CD8-Molekül (53.6.72) oder gegen ein unbekanntes Epitop (MOPC 21) verabreicht wurden; Werte (Mittelwerte; in Klammern

Standardabweichungen) wurden nach durchflußzytometrischer Messung mittels Quadrantenanalyse ermittelt

#### **4.5. Einfluß eines STZ-induzierten Diabetes auf die Expression von Aktivierungsmarkern auf Blutlymphozyten**

Lymphozyten exprimieren im Verlauf ihrer Aktivierung (2.2.) Proteine auf ihrer Zelloberfläche, die als Aktivierungsmarker bezeichnet werden. Mit der Darstellung dieser Marker auf den Blutlymphozyten kann der „Aktivierungszustand“ dieser Immunzellpopulationen untersucht werden. Da eine Beteiligung der Lymphozyten an der Pathogenese des STZ-Diabetes aus den vorherigen Studien vermutet werden konnte, sollte mit der FACS-Analyse der Aktivierungsmarker geklärt werden, ob eine Aktivierung von Blutlymphozyten auftritt.

Mittels einer Dreifarben-FACS-Analyse wurden die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD71 den CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> Zellpopulationen einer Probe aus peripherem Vollblut zugeordnet. Blutproben von CD4/DR17-Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten nach STZ-Behandlung bzw. vor der Behandlung wurden untersucht. Es konnte eine nicht signifikante Zunahme der Expression von Aktivierungsmarkern auf CD8<sup>+</sup> Zellpopulationen erfaßt werden.

Die Untersuchung fand an zwölf CD4/DR17-Mäusen statt, die am Tag 0 mit 1x 80 und an den vier darauffolgenden Tagen mit 40 mg/kg K.G. STZ behandelt wurden (siehe 4.2.2.1. B). Von den 12 Tieren werden 11 Tiere hyperglykämisch. Die FACS-Analyse erfolgte an den Tagen – 3, 9, 24 und 34. Aus dem Wert des mittleren Fluoreszenzsignales (MF) des Messbereiches (Kanal), in dem der markierte Antikörper gegen den jeweiligen Aktivierungsmarker dargestellt wird, wurde ein Verhältniswert errechnet, der für das Ausmaß der Expression des Markers auf der jeweiligen Zellpopulation steht; hierfür ist der Quotient aus der mittleren Fluoreszenz des zweiten Kanals (der Kanal, in welchem durch PE-Färbung, die Oberflächenmoleküle CD25, CD69 und CD71 dargestellt werden) der jeweils betrachteten Zellpopulation (CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>Zellen) und der mittleren Fluoreszenz des zweiten Kanals der gesamten Zellpopulation, die im Lymphozytengate liegt, gebildet worden. Dieser Quotient ist höher als 1, wenn die mittlere Fluoreszenz der untersuchten Zellpopulation höher ist, als die durchschnittliche Fluoreszenz sämtlicher Zellen. Mit dem Wert stellt sich die Expression von Aktivierungsmarkern bestimmter Zellpopulationen in Bezug zur Gesamtzellpopulation dar. Die erhaltenen Werte der unterschiedlichen Tiere bzw. unterschiedlichen Ansätze (Zeitpunkte) können miteinander verglichen werden, ohne dass unspezifische Schwankungen die

Ergebnisse verfälschen, wenn angenommen wird, dass unspezifische Effekte die Zellen in ihrer Gesamtheit im gleichen Maße wie die im speziellen betrachtete Zellpopulation betreffen. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gegeneinander aufgetragen.

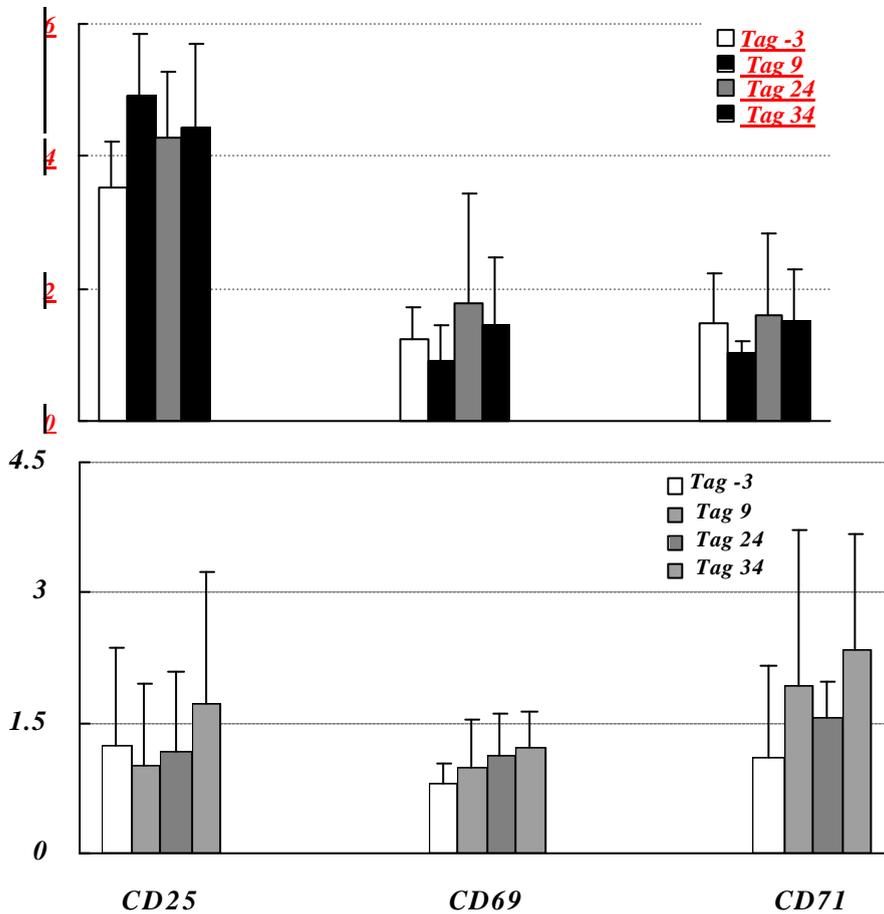


Abb.23 u.24: Expression der Aktivierungsmarker auf CD4<sup>+</sup> Zellen (oben, Abb.23) und CD8<sup>+</sup> Zellen (unten, Abb.24) des Blutes aus CD4/Dr17-Mäusen als Verhältnis der mittleren Fluoreszenz der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen und der mittleren Fluoreszenz der Gesamtpopulation der Lymphozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach STZ-Behandlung

## 5. Diskussion

Beim murinen MLD-STZ-Diabetes treten mausstammspezifische Unterschiede auf, die sowohl das Auftreten einer Insulinitis (ROSSINI et al., 1977 b), als auch das Auftreten einer Hyperglykämie betreffen (WOLF et al., 1984). Für einen neuen Mausstamm muss daher experimentell geprüft werden, ob sich das MLD-STZ-Modell als Modell für den Typ 1 Diabetes im betreffenden Mausstamm eignet.

Die Arbeit konnte zeigen, dass die CD4/DR17-Maus suszeptibel gegenüber der Induktion eines Diabetes durch mehrfache Dosen von STZ ist. Eine mitunter transiente Hyperglykämie (4.2.3.) geht dabei mit dem Verlust an insulinhaltigen Inselzellen (4.3.2.3.) und einer Insulinitis (4.3.2.4.) einher. Damit weist dieser induzierte Diabetes Merkmale auf, die ihn als Modell für bestimmte Fragestellungen zum menschlichen Typ 1 Diabetes ausweisen. Da der beschriebene Diabetes nicht in ein für die CD4/DR17-Maus tödliches Krankheitsgeschehen mündete, sind an dem Modell auch Effekte von therapeutischen Interventionen zu erwarten, die in schweren Krankheitsverläufen keine Wirkungen zeigen würden.

### 5.1. Hyperglykämie bei der STZ-behandelten CD4/DR17-Maus

Nach STZ-Behandlung wurden unterschiedliche Verläufe von Hyperglykämien beobachtet: Entweder entwickelte sich innerhalb der ersten 10 Tage nach Beendigung der STZ-Behandlung eine transiente Hyperglykämie, welche die Werte bis 15 mmol/l nicht überschritt, oder es bildete sich eine Hyperglykämie mit Werten über 20 mmol/l aus, die im weiteren Verlauf Schwankungen aufwies, der Blutzucker sich in den ersten vierzig Tagen jedoch nicht normalisierte (4.2.3.; 4.4.1.).

Es zeigte sich, dass die Inzidenz der Hyperglykämie dosisabhängig war und dass STZ-Dosierungen von 5x40 mg/kg K.G. und 1x80 + 4x40 mg/kg K.G. in der Lage waren, aneinander ähnliche Blutglukoseverläufe hervorzurufen (4.2.3.). Blutglukoseverläufe und Inzidenzen von Hyperglykämien der CD4/DR17-Maus unterschieden sich in unterschiedlichen Versuchen bei Verwendung gleicher STZ-Dosierungen (4.2.3., 4.4.1., 4.3.1. und 4.3.2.1.). Hierbei ist die im Laufe dieser Studien vorangegangene Züchtung der CD4/DR17-Maus zu berücksichtigen. In den Studien wurden Tiere unterschiedlicher Inzuchtgenerationen verwendet (3.1.2.). Nach internationalen Richtlinien für die Züchtung von Inzuchtmausstämmen ist erst nach 20 Generationen von Geschwisterpaarungen eine genetisch einheitliche Linie zu erwarten (DAVISSON, 1996). Die genetische Inhomogenität des zugrundeliegenden CD4/DR17-Mausstammes spiegelte sich im Auftreten von

Segreganten wider, die uns in der Studie dazu dienten, die Bedeutung der transgenen Moleküle für den MLD-STZ-Diabetes der CD4/DR17-Maus zu bestimmen.

Die Entwicklung der Hyperglykämie verlief nicht progressiv, sondern - über einen Zeitraum von über 40 Tagen betrachtet - transient. Es starben keine Versuchstiere an den Folgen der STZ-Behandlung. Eine Regulationsfähigkeit ging somit nicht vollständig verloren. Dies wird ebenso in den OGTTs deutlich, bei denen innerhalb einer Stunde nach Glukoseverabreichung der Blutzuckerspiegel auch bei STZ-behandelten Tieren wieder sinkt (4.2.2.).

Beim MLD-STZ-Diabetes bildet sich generell – mausstammabhängig - eine tolerierte Hyperglykämie. Dies ist auch Ausdruck einer relativen Resistenz der Spezies Maus gegenüber einer Hyperglykämie. So schreiben ITO et al. (1999), dass bei einer einzelnen Dosis von 200 mg/kg K.G. Streptozotozin in ICR-Mäusen Blutglukosewerte um 45 mmol/l von den Mäusen über 9 Wochen lang toleriert werden. Die spontan diabetische NOD-Maus überlebt die auftretende Hyperglykämie für 3-4 Wochen. Die Normalisierung des Blutzuckerspiegels nach MLD-STZ-Behandlung ist ebenso beschrieben worden (HARTMANN, 1989) und wurde mit einer möglichen Neubildung von  $\beta$ -Zellen erklärt (FERNANDEZ et al., 1997). Die mausstammspezifischen Unterschiede in der Antwort auf die MLD-STZ-Behandlung sind in der wissenschaftlichen Literatur häufig anhand des unterschiedlichen Ausmaßes der Hyperglykämien dargestellt: Eine MLD-STZ-Behandlung führt bei männlichen CD-1-sowie C57BL/6-Mäusen zu einer Hyperglykämie mit Werten um 30 mmol/l, ohne dass eine Normalisierung der Blutglukosewerte eintritt (LIKE et al., 1978). Bei BALB/c-Mäusen liegen offensichtlich aufgrund unterschiedlicher Unterstämme einander gegensätzliche Befunde vor (WILSON u. LEITER, 1990). So entwickeln BALB/c-Mäuse in den Studien von BÜYÜKDEVİRİM (1994) einen MLD-STZ-Diabetes, wohingegen sie bei HEROLD (1997) als resistent bezeichnet werden, welcher bei C57BL/KsJ-Mäusen eine Hyperglykämie bis 20 mmol/l bis zum Tag 19 beschreibt. Auch im Vergleich zu männlichen BK-Mäuse waren BALB/c-Mäuse unempfindlich, wogegen BK-Mäuse nach der Verabreichung von 5x40 mg/kg K.G. STZ eine schwere, irreversible Hyperglykämie (30 mmol/l) entwickelten, welche bis über den Tag 100 dokumentiert wurde (ELIAS et al., 1994). Eine bis zum Tag 30 ansteigende Hyperglykämie bis zu Werten von 25-30 mmol/l konnten WOLF et al. (1984) für die meisten untersuchten Stämme (CBA/J, C57BL/10SnJ, C57BL/KsJ, DBA/2J, SJL) feststellen, wohingegen C3H/An- und C57BL/6J-Mäuse relativ resistent (Blutglukosewerte bis 10 mmol/l) gegenüber der MLD-STZ-Diabetes-Induktion waren. Die CD4/DR17-Maus kann

somit als vergleichsweise gut suszeptibel gegenüber der Induktion einer Hyperglykämie durch die MLD-STZ-Behandlung angesehen werden.

### **5.2. Verlust insulinhaltiger Inselzellen bei der STZ-behandelten CD4/DR17-Maus**

Während eine Hyperglykämie nicht allein der Ausdruck einer  $\beta$ -Zell-Zerstörung, sondern die Folge komplexer Störungen sein kann (Kap. 2.4.), gibt die immunhistochemische Bestimmung der insulinhaltigen Inselzellen einen direkteren Hinweis auf eine stattgefundene Zerstörung von  $\beta$ -Zellen.

Die Resultate zeigen den deutlichen Verlust insulinproduzierender oder insulinspeichernder Zellen in Inseln STZ-behandelter CD4/DR17-Mäuse. Mittels digitaler Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Inseln konnte dieser Verlust an insulinhaltigen Zellen als eine Abnahme von durchschnittlich 65% auf unter 20% der Inselfläche quantifiziert werden (4.3.2.3.). Die immunhistochemische Darstellung des Insulins ist wegen ihrer Spezifität und Empfindlichkeit anderen  $\beta$ -Zell-spezifischen Färbetechniken überlegen (LUCKE et al., 1985). Die quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Zell-Schädigung mittels immunhistologisch-morphologischer Methoden ist in ähnlicher Weise von BURKART et al. (1999) durchgeführt worden. In seinen Studien reduzierte sich durch die einmalige Gabe von 160 mg/kg STZ die Fläche der insulinhaltigen Zellen in den Inseln von 70% auf 25%. In der selben Arbeit wies er mittels biochemischer Nachweisverfahren einen Rückgang des Insulingehaltes von 6 auf 0,3  $\mu\text{g}$  pro 100 mg Pankreasgewebe nach. Ein vergleichbarer Rückgang des Insulingehaltes nach MLD-STZ-Behandlung wurde in CD-1-Mäusen ermittelt. Sechs Tage nach der letzten STZ-Injektion der MLD-STZ-Behandlung sind nur noch 20% des ursprünglichen Gehaltes extrahierbaren Insulins im Pankreasgewebe nachweisbar (LIKE et al., 1978), nach 28 Tage ist der Insulingehalt auf 15% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert (IWAKIRI et al., 1990). Der Verlust der insulinhaltigen Inselfläche bei der CD4/DR17-Maus nach MLD-STZ-Behandlung entspricht somit den beschriebenen  $\beta$ -Zell-Verlusten, die in anderen Mausstämmen zu einer Hyperglykämie führen.

### **5.3. Auftreten von Insulitiden bei STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen**

Neben Hyperglykämie und Verlust insulinhaltiger Inselzellen ist der MLD-STZ-Diabetes der CD4/DR17-Maus durch Infiltrationen mononukleärer Zellen in Inseln und Inselnähe gekennzeichnet. Diese erscheinen sowohl nach der Behandlung mit 5x40 mg/kg als auch nach der Behandlung mit 1x80 und 4x40 mg/kg STZ. Dabei handelte es sich um Infiltrate in Inselnähe (Periinsulitiden) und um Infiltrate in Inseln (Insulitiden). Gleichzeitig waren auf den

untersuchten Schnitten behandelter Mäuse intakte Inseln ohne Anzeichen von Infiltrationen zu sehen (4.1.4.; 4.3.2.4.).

IWAKIRI et al. (1990) beschrieben die chronologische Veränderung der Insulitis beim MLD-STZ-Diabetes in der CD1-Maus, die sich von einer Perivaskulitis zu einer Periinsulitis und schließlich Insulitis entwickelt. Somit können Periinsulitiden als Vorstufen zu Insulitiden angesehen werden. Andererseits handelt es sich bei Periinsulitiden nicht *per se* um Frühstadien einer Insulitis. Vielmehr wird beim Autoimmundiabetes zwischen einer benignen, nicht-invasiven Insulitisform, die sich nicht aus dem Stadium einer Periinsulitis herausentwickelt, und einer destruktiven, infiltrativen Insulitis unterschieden (PAKALA et al., 1999). Somit ist ein aggressives Autoimmungeschehen vor allem durch das Auftreten von Insulitiden des Grades II gekennzeichnet. Bei der CD4/DR17-Maus treten am Tag 40 in ca. einem Viertel aller Inseln Infiltrationen des Grades II auf (4.3.2.4.; 4.4.4.). Das Auftreten von Insulitiden sowie Periinsulitiden zu diesem späten Zeitpunkt weist darauf hin, dass die kurzzeitigen direkten toxischen Wirkungen des STZ (LEE et al., 1993) einen chronischen Entzündungsprozeß in Gang gesetzt haben. Da sich der STZ-Diabetes in der CD4/DR17-Maus über den Tag 40 hinaus nicht progressiv entwickelt, sondern sich die Blutglukosewerte bis zum Tag 70 normalisieren (4.2.1.), ist denkbar, dass sich die Zahl der infiltrierten Inseln am Tag 40 bereits reduziert hat. Studien über den Zeitverlauf des MLD-STZ-Diabetes (LIKE et al., 1978; IWAKIRI et al., 1990) belegen einen Rückgang der Insulitiden zwischen Tag 28 und Tag 56: In CD-1-Mäusen sind demnach 7 Tage nach Beginn der STZ-Behandlung 16% der Inseln infiltriert, 58% am Tag 28 und nur noch 43% am Tag 56 (IWAKIRI et al., 1990).

#### **5.4. Vergleich der STZ-Wirkung bei der CD4/DR17-Maus und transgenen Segreganten**

Beim Vergleich zwischen den Segreganten, denen CD4 bzw. DR17 fehlte, und der CD4/DR17-Maus traten Unterschiede in der Entwicklung hyperglykämischer Blutglukosespiegel auf: Schwerere diabetische Verläufe kamen in transgenen Mäusen ohne CD4 bzw. ohne DR17 seltener vor (4.3.2.1.). Ebenso zeigten Unterschiede im Auftreten einer infiltrierenden Insulitis (4.3.2.4.) und hinsichtlich des Insulingehaltes der Inseln (4.3.2.3.), dass für die Ausprägung der pathognomonischen Merkmale des Diabetes offensichtlich beide transgenen Merkmale von Bedeutung sind. Unterschieden in der Inzidenz und im Auftreten von Insulitiden und Insulingehalt stehen aber nahezu identische hyperglykämische Verläufe einzelner Tieren aus allen unterschiedlichen Gruppen gegenüber (4.3.2.1.). Ebenso fällt die unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Insulitisgrade nicht mit den unterschiedlichen

Inzidenzen einer Hyperglykämie zusammen, weil diese gruppenspezifischen Unterschiede bei den Insulitiden sowohl zwischen hyperglykämischen als auch zwischen nicht-hyperglykämischen Tieren der unterschiedlichen Gruppen bestehen bleiben (4.3.2.4., Tabelle 14). Dies zeigt, dass es keinen einfachen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hyperglykämie, der Insulitis und dem Insulingehalt gibt. Diese paradoxe Beobachtung wird durch verschiedene Autoren bestätigt. So beschreiben BEATTIE et al. (1980), dass sich trotz des Fehlens einer Insulitis in athymischen Nacktmäusen nach MLD-STZ-Behandlung sowohl eine Hyperglykämie als auch ein  $\beta$ -Zell-Verlust zeigen und sich diese Parameter in solchen von diesen Mäusen abstammenden Kreuzungen, die einen Thymus aufweisen und eine Insulitis entwickeln, nicht unterscheiden. Somit ist beim MLD-STZ-Diabetes zwar eine Insulitis, nicht aber eine  $\beta$ -Zellschädigung von der Gegenwart funktioneller Lymphozyten abhängig; dies zeigte auch der Vergleich zwischen C.B17-SCID- und C57BL/6-Mäusen (LU et al., 1998). Ebenso wenig ist die Insulitis für das Ausmaß der  $\beta$ -Zell-Schädigung in direkter Weise ausschlaggebend. Dies zeigten PAPACCIO et al. (1992), indem sie durch die Verabreichung von komplettem Freund'schen Adjuvans beim MLD-STZ-Diabetes in C57BL/6J-Mäusen eine Insulitis verhindern konnten, ohne dass hierdurch das Ausmaß der  $\beta$ -Zell-Schädigung beeinflusst wurde. Daraus ist zu schließen, dass die  $\beta$ -Zell-Schädigung auch in einem solchen Mausstamm, in dem sich normalerweise eine Insulitis entwickelt, nicht direkt von der Insulitis abhängig ist. Nur in bestimmten Stämmen besteht eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Insulitis und der Hyperglykämie (NAKAMURA et al., 1984).

Die Insulitis trägt auch mit Entzündungsfaktoren zur Ausprägung einer Hyperglykämie bei, ohne dass diese eine irreversible Schädigung der  $\beta$ -Zellen hervorgerufen haben müssen. Gleichzeitig können funktionsfähige, insulinhaltige Inselzellen eine Restregulation ausüben. Mäuse mit unterschiedlicher  $\beta$ -Zell-Schädigung und eventuell verschieden ausgeprägten Störungen der  $\beta$ -Zell-Funktionen regulieren ihren Blutglukosespiegel also durch Inseln mit vorhandenen Restfunktionen, was heißt, dass Unterschiede zwischen den Mäusen im Ausmaß der Schädigung oder im Ausmaß der Entzündungen kompensiert werden können, bzw. evtl. unterschiedliche Fähigkeiten zur Kompensation der Schädigung die klinischen Erscheinungen beeinflussen.

Die Unterschiede im Auftreten von Hyperglykämien und Insulitiden zwischen den transgenen Segreganten und der CD4/DR17-Maus implizieren, dass am STZ-Diabetes CD4<sup>+</sup> Zellen beteiligt sind. Die humanen CD4-Moleküle der transgenen Tiere können dabei außerdem mit dem humanen MHC-Klasse II-Molekül DR17 besser interagieren als mit murinen MHC-

Klasse II-Molekülen, wie dies durch die Studien von VIGNALI et al. (1992) bestätigt wird. Die funktionelle Präsenz solcher CD4<sup>+</sup> Zellen wirkt auf das Auftreten von Insulitiden, wodurch die Hyperglykämie beeinflusst werden kann. Das Fehlen von CD4<sup>+</sup> Zellen ging nicht mit einem gänzlichen Ausbleiben von Insulitiden einher; die auftretenden Entzündungen waren aber im Schweregrad vermindert und in der Mehrzahl Periinsulitiden (4.3.2.4.). Nur in wenigen Tieren aus der Gruppe der CD4<sup>-</sup>/DR17-Mäuse kamen Insulitiden des Grades II vor. Das Fehlen beider transgener Merkmale bei der CD4<sup>-</sup>-Maus führte zu einer stärkeren Beeinträchtigung der Ausbildung der Immunkomponente eines STZ-induzierten Diabetes, ein Phänomen, das im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht erklärt werden kann.

Unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber den Wirkungen des STZ können außer auf den Transgenen auch auf genetischen Allelen beruhen, die für eine unterschiedliche Expression des GLUT2-Transporterproteins verantwortlich sind (REDDY et al., 1998) oder die Akkumulation von STZ-Metaboliten in den Inseln beeinflussen, was zu unterschiedlichen Graden an  $\beta$ -Zell-Zerstörung führt (CARDINAL et al., 1998). Dies beeinflusst auch das Auftreten von Insulitiden als eine Folge der  $\beta$ -Zell-Schädigung.

Zusammengefaßt sind bei der Interpretation der Ergebnisse aus den Experimenten mit CD4/DR17-Mäusen im Vergleich zu unterschiedlichen, transgenen Segreganten verschiedene Hypothesen möglich:

1. Der genetische Status der Mäuse ist inhomogen. Möglicherweise bestehen daher unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber den toxischen Wirkungen des STZ oder hinsichtlich der Regenerations- oder Kompensationsfähigkeiten der  $\beta$ -Zellen. Diese unterschiedlichen Suszeptibilitäten der unterschiedlichen Segreganten führen zu verschiedenen häufig auftretenden Entzündungsinfiltraten in den Inseln. Bei diesen Entzündungen kann es sich um Entzündungen als Folge von  $\beta$ -Zell-Nekrosen handeln. Solche Entzündungen sind nicht abhängig von einer spezifischen Erkennung eines Autoantigens und treten daher auch in Mäusen auf, deren CD4<sup>+</sup> Zellen fehlen.
2. Das Ausmaß der Insulitiden wird durch das Vorhandensein von funktionellen CD4<sup>+</sup> Zellen beeinflusst. Ein Fehlen dieser Zellen oder das Fehlen von humanem MHC-Klasse II-Molekülen in Mäusen, die humanes CD4 exprimieren, führt zu einer Abmilderung der Entzündungsreaktionen. Die Entzündungsreaktionen tragen durch Entzündungsmediatoren dazu bei, die durch die toxische Wirkung des STZ vorgeschädigten  $\beta$ -Zellen zu zerstören.
3. Im Verlauf der STZ-induzierten Schädigung von  $\beta$ -Zellen kommt es zur Präsentation von Autoantigenen bzw. einem durch STZ haptenartig markiertem Autoantigen. CD4<sup>+</sup> Zellen

erkennen über DR17 präsentierte Autoantigene bzw. Neoantigene, wodurch es zur gezielten Immunreaktion gegen Inselzellen kommt. Bei fehlenden CD4<sup>+</sup> Zellen kann die Antigenerkennung nicht stattfinden. Ein Fehlen des MHC-Klasse II-Moleküls DR17 führt zu einer mangelhaften Interaktion zwischen MHC-Klasse II-Molekül und transgenem CD4, außerdem zur Präsentation anderer Epitope und zur Entwicklung eines anderen T-Zell-Rezeptor-Repertoires. Möglicherweise werden bestimmte Epitope, die notwendig sind, um eine gegen  $\beta$ -Zellen gerichtete starke Autoimmunreaktion auszulösen, nicht präsentiert. Diese Faktoren führen schließlich dazu, dass in Segreganten eine verminderte  $\beta$ -Zellschädigung eintritt und sich bei diesen seltener eine Hyperglykämie entwickelt.

Der heterogene Maus-MHC-Klasse II-Hintergrund der verwendeten CD4/DR17-Maus erschwert die tierexperimentelle Untermauerung einer solchen Interpretation. Denn neben der Expression von murinen MHC-Klasse II-Molekülen können ebenso heterodimere Moleküle gebildet werden, deren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von murinen und transgen-humanen Allelen stammen (STRAUSS et al., 1994). In vergleichbaren Ansätzen bewirkt erst die Deletion der murinen MHC-Klasse II-Moleküle eine allein vom transgenen MHC-Klasse II-Molekül kontrollierte Auswahl des T Zell-Rezeptor-Repertoires (SØNDERSTRUP et al., 1999).

### **5.5. Beeinflussung des STZ-induzierten Diabetes der CD4/DR17-Maus mittels anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörperbehandlung**

Mit einer Antikörperbehandlung drei Tage nach Beginn der Krankheitsinduktion durch STZ-Behandlung haben wir auf die therapeutische Anwendung von monoklonalen Antikörpern im Frühstadium eines Diabetes hingezielt. Ein frühes Stadium des Krankheitsverlaufes ist beim Menschen durch die Untersuchung auf Autoantikörper diagnostizierbar, da diese bereits Jahre vor den ersten klinischen Manifestationen auftreten können (BINGLEY, 1997).

Die zur Verwendung gekommenen anti-CD4-mAk MAX16H5 und MAX12F6 waren zuvor in Studien zur Toleranzinduktion zum Einsatz gekommen, wobei sich herausgestellt hatte, dass es sich um mAk mit immunmodulatorischem Potential handelt (KÖHLER et al., 2001), die in einem unterschiedlichen Ausmaß zur Teildepletion von CD4<sup>+</sup> Zellen führen. Auch bei der anti-CD8-mAk-Behandlung wurde mit der gewählten Dosierung keine vollständige Depletion erzielt (4.4.5.). Mit der Antikörperbehandlung eines MLD-STZ-Diabetes nach Beginn der STZ-Behandlung unterscheidet sich das Experiment von bisher veröffentlichten Studien, in denen durch die Vorbehandlung mit depletierenden Antikörpern eine Rolle der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen an der Manifestation des MLD-STZ-Diabetes dargestellt werden konnte (DAYER-METROZ et al., 1988).

Der Arbeit gingen eigene Experimente voraus, in denen durch die mehrfache Verabreichung von anti-CD4-mAk an CD4/DR17-Mäuse, die bereits eine Hyperglykämie entwickelt hatten, der Verlauf der Hyperglykämie nicht beeinflußt werden konnte. Die Behandlung nach der dritten Injektion von STZ-Behandlung findet zwar vor dem Auftreten von klinischen Zeichen statt, dennoch hat das STZ zu diesem Zeitpunkt bereits  $\beta$ Zellen geschädigt sowie eine Entzündungsreaktion in den Inseln erzeugt. So reicht die einmalige Gabe von 5 mg/kg STZ aus, um Makrophagen in das Inselgebiet zu locken und bereits 24 h nach STZ-Verabreichung kann eine erhöhte Adhäsion von Lymphozyten in den Inseln beobachtet werden (KUSTERER et al., 1999). Nach der vierten Injektion kommt es in weiblichen Swiss-Mäusen bei einem Teil der  $\beta$ -Zellen zu einem Verlust an GLUT2. Einige Inseln sind bereits zu diesem Zeitpunkt von Makrophagen infiltriert, während sich T-Zellen noch nicht angesammelt haben (REDDY et al., 1998).

Die Effekte der anti-CD4-mAk-Behandlung mit nicht-depletierenden Antikörpern beruhen wahrscheinlich, neben einer möglicherweise selektiven Teildepletion, auf der Blockierung von Zellverbindungen zwischen antigenspezifischen  $CD4^+$  Zellen und MHC-Klasse II-tragenden APCs (BIDDISON et al., 1984). Die Behandlung mit anti-CD8-mAk sollte klären, ob eine späte Therapie mit anti-CD8-Ak protektiv auf einen STZ-Diabetes wirkt.

Die dargestellten Versuche haben gezeigt, dass mit einer am Tag 3 einsetzenden anti-CD8-mAk-Behandlung therapeutische Effekte beim STZ-Diabetes erzielt werden können, die mit einer Verringerung an Insulitiden einhergehen. Dies bestätigt die Rolle der  $CD8^+$  Zellen als wichtige Effektorzelle beim STZ-Diabetes. Es ist bekannt, dass STZ die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen in Inseln erhöht (COCKFIELD et al., 1989). Eine spezifische Immunantwort gegen STZ steht unter der Kontrolle von MHC-Klasse I (CHOQUET-KASTYLEVSKY et al., 2000). In Studien über die Effekte von Antikörperbehandlungen vor STZ-Gabe auf die Entwicklung des induzierten Diabetes konnte man durch die Verabreichung von Antikörpern gegen das CD3-Molekül, die somit sowohl gegen  $CD4^+$  als auch gegen  $CD8^+$  Zellen gerichtet waren, einen STZ-Diabetes verhindern (ROSSINI et al., 1977 a; OSCHILEWSKI et al., 1986). Gegen das CD8-Molekül gerichtete Antikörper waren effektiv in der Verhinderung oder Verzögerung eines STZ-Diabetes (HEROLD et al., 1987; DAYER-MÉTROZ et al., 1988). Der Antikörper des Klonen 53.6.72 konnte einen STZ-Diabetes in transgenen Mäusen verhindern, welche das Aktivierungsmolekül B7-1 selektiv auf Inselzellen exprimieren; anti-CD4-mAk hatten dagegen in dem Modell keinen Einfluß auf die Diabetes-Entwicklung (HARLAN et al., 1995). Ebenso wenig konnten anti-CD4-mAk in unseren

Versuchen den STZ-Diabetes-Verlauf signifikant abmildern. Es zeigte sich jedoch, dass die anti-CD4-mAk MAX16H5 und MAX12F6 unterschiedliche Wirkungen entfalten:

Die Verabreichung von MAX12F6 hatte einen beschleunigenden Effekt auf den diabetischen Prozeß (4.4.1.). Dies ging einher mit einer erhöhten Inzidenz von Insulitiden (4.4.4.). Ein solcher Effekt einer anti-CD4-mAk-Behandlung auf einen experimentellen Diabetes ist bisher nicht bekannt (persönliche Auskunft von Anne Scott, Cambridge, England), obgleich denkbar ist, dass es durch eine anti-CD4-mAk-Behandlung auch zur Störung funktionell protektiver, regulatorischer CD4<sup>+</sup> Zellen kommt. Fünf bis zehn Prozent der peripheren CD4<sup>+</sup> Zellen scheinen solche regulatorischen Funktionen zu übernehmen, die der Erhaltung der Toleranz gegenüber Autoantigenen dienen (SAKAGUCHI, 2000). So verstärkt die Behandlung mit Zyklophosphamid den STZ-Diabetes, indem wahrscheinlich bestimmte Suppressorzellen unterdrückt werden (KIESEL et al., 1981b). Die Behandlung mit nicht-depletierenden anti-CD4-Antikörpern scheint dagegen nicht nur autoaggressive Effektorzellen zu beeinträchtigen, sondern toleranzinduzierende Zellen sogar zu aktivieren (PHILLIPS et al., 2000). Die Wirkung des MAX12F6-mAk kann somit schwerlich erklärt werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Beschleunigung des Diabetes um einen sekundären Effekt der anti-CD4-mAk-Behandlung. Sollte es durch eine starke immunsuppressive Wirkung des MAX12F6-mAk beispielsweise zu einer subklinischen Infektion bei den behandelten Tieren gekommen sein, ist denkbar, dass diese in der Folge den STZ-Diabetes beschleunigt hat. Ebenso können unbekannte oder bakterielle Verunreinigungen in der Antikörperlösung den STZ-Diabetes beeinflusst haben, da auch die Verabreichung von bakteriellen Lipopolysacchariden einen STZ-Diabetes verstärkt (FLECHNER et al., 1984).

Demgegenüber ist der Effekt von MAX16H5 nicht deutlich gegenüber der mit MOPC21 behandelten Gruppe (4.4.1.). Auch in der MOPC21 behandelten Gruppe bildete sich in einer von vier Mäusen keine Hyperglykämie. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit dem mAk MOPC21, der gegen ein unbekanntes Antigen gerichtet ist, einen teilprotektiven Effekt hatte. Solche „unspezifischen“ Effekte von Antikörpern sind bei der Antikörperbehandlung des spontanen Diabetes der NOD-Maus beschrieben worden (TODD et al., 1977). Das Auftreten von Insulitiden in den mit Antikörpern behandelten Mäusen bestätigt, dass mit dem Behandlungsschema die Immunkomponente des STZ-Diabetes nicht dauerhaft unterdrückt wurde. Es sind Experimente beschrieben, in denen eine Antikörperbehandlung das Auftreten von Insulitiden beim MLD-STZ-Diabetes verhindert hat (HEROLD et al., 1987; DAYER-MÉTROZ et al., 1988). Im NOD-Modell haben SHIZURI et

al. (1988) gezeigt, dass eine anti-CD4-Ak-Behandlung auch eine bereits bestehende Insulinitis mildern kann. Ebenso wurde im NOD-Modell jedoch dargestellt, dass 80 Tage nach Beendigung der anti-CD4-Ak-Behandlung Insulitiden im gleichen Ausmaß wie in unbehandelten NOD-Mäusen auftraten (CHARLTON u. MANDEL, 1989). Nach erfolgter Depletion korreliert dabei das Auftreten einer Hyperglykämie mit dem Wiederauftauchen von CD4<sup>+</sup> Zellen im Blut (WANG et al., 1987). Da im vorgestellten Experiment die letzte Antikörperbehandlung bereits drei Wochen vor dem Ende des Experimentes liegt, ist demnach denkbar, dass ein Teil der Insulitiden erst nach Beendigung der Antikörperbehandlung aufgetreten ist, da bei einem STZ-Diabetes die Einwanderung von Immunzellen in die Inseln innerhalb von 21 Tagen stattfindet (IWAKIRI et al., 1990).

### **5.6. Expression von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten STZ-behandelter CD4/DR17-Mäuse**

T-Zell-Aktivierung geht mit der Expression bestimmter Markerantigene an der Zelloberfläche einher. Die FACS-Analyse des Blutes von STZ-behandelten CD4/DR17-Mäusen sollte solche funktionellen Veränderungen von T-Zellen untersuchen. Für die Analyse wurden Aktivierungsmarker gewählt, die in der humanen Diagnostik weit verbreitet sind.

CD25 ist die Bezeichnung für die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors, der im Rahmen der Aktivierung von T-Zellen exprimiert wird (SAKAGUCHI et al., 1996). CD69 ist ein bei der Aktivierung sehr früh auftretendes Molekül, das möglicherweise rezeptorähnliche Funktionen ausübt. Sein Ligand ist unbekannt. Bekannt ist, dass über CD69 eine intrazelluläre Signalkette ausgelöst wird (MARZIO et al., 1999). CD71 ist das Transferrinrezeptormolekül, das im Laufe der Aktivierung spät exprimiert wird. *In vitro* führt die Stimulation von menschlichen T-Lymphozyten mit Phytohämagglutinin nacheinander zur zeitweisen Expression von CD69 nach 24 und 48 h, CD71 nach 96 h und CD25 mit kontinuierlicher Steigerung der Expression und einem Maximum nach 120 h auf den Zellen (GIORDANO et al., 1993).

Die Ergebnisse zeigen lediglich geringgradige Veränderungen in der Expression der Aktivierungsmarker im Laufe des MLD-STZ-Diabetes (4.5.). Die Expression der Aktivierungsmarker wies in der Studie starke individuelle Unterschiede auf. Nach STZ-Behandlung tauchten keine neuen diskreten Populationen mit starker Expression von Aktivierungsmarkern auf; CD4/CD25 doppelpositive Lymphozyten waren sowohl in unbehandelten als auch in behandelten Mäusen detektierbar, wobei es sich dabei wahrscheinlich um eine Population regulatorischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt, bei denen CD25 konstitutiv exprimiert wird (SAKAGUCHI et al., 1996). Ergebnisse von Studien an

diabetischen Patienten hatten demgegenüber demonstriert, dass bei einem Typ 1 Diabetes aktivierte T-Lymphozyten auftreten. Vergleichbare Studien an STZ-behandelten Mäusen liegen dagegen bisher nicht vor. GESSL u. WALDHÄUSL (1998) zeigten am Menschen, dass im peripheren Blut sowohl auf CD8<sup>+</sup> als auch auf CD4<sup>+</sup> Zellen die Expression von CD69 verstärkt ist. Die Zahl der CD25 exprimierenden T-Zellen war bei frisch diagnostizierten Diabetikern erhöht (KONTIAINEN et al., 1991; PEAKMAN et al., 1994). Bei diesem Marker konnten PETERSEN et al. (1999) und QUINIOU-DEBRIE et al. (1985) auch eine Veränderung des Verhältnis der CD4<sup>+</sup>: CD8<sup>+</sup> zugunsten der CD4<sup>+</sup> Population zeigen. Bei NOD-Mäusen konnte eine Hochregulation der CD25- und CD69-Moleküle auf Lymphozyten aus den Lymphknoten diabetischer Mäuse beobachtet werden (GOLDRATH et al., 1995), während bei den aus dem Blut isolierten Lymphozyten solche Veränderungen nicht gefunden wurden. Trotz der schnelleren Entwicklung des Diabetes beim MLD-STZ-Modell mag auch hier die Auswirkung der lokalen Entzündung auf die Immunzellen des peripheren Blutes gering sein oder in einem engen Zeitfenster liegen. Im Verlauf des STZ-Diabetes veränderte sich die Expression der Aktivierungsmarker nicht einheitlich. Die individuellen Unterschiede in der Expression dieser Marker zwischen den Mäusen wurden stärker, was sich in größer werdenden Standardabweichungen widerspiegelt; es mag dies als ein Hinweis auf die Aktivierung einzelner T-Zellen des peripheren Blutes beim MLD-STZ-Diabetes in der CD4/DR17-Maus gewertet werden. Da sich die Mäuse in der Entwicklung ihrer Hyperglykämien nicht wesentlich unterscheiden, sind diese Veränderungen nicht auf die Hyperglykämien zurückzuführen.

### **5.7. Abschließende Betrachtungen**

Obwohl die CD4/DR17-Maus sich zum Zeitpunkt der Versuche noch nicht als Inzuchtstamm präsentierte, liefern die in dieser Arbeit dargestellten Versuche Erkenntnisse über die Verwendbarkeit dieses transgenen Mausmodells, indem sie belegen, dass die Expression der Transgene innerhalb komplexer Krankheitsmodelle zu keinen offensichtlichen Funktionsverlusten der Immunzellen geführt hat, welche die Transgene exprimieren. Die Experimente weisen teilweise den Charakter von Pilotstudien auf. Der Mangel an Versuchstieren zur Zeit der Versuche erlaubte es nicht, mit größeren Versuchstiergruppen zu experimentieren. In unterschiedlichen Versuchsgruppen auftretende Unterschiede zeigten bis auf wenige Ausnahmen daher keine statistischen Signifikanzen, wodurch den Ergebnissen teilweise nur ein phänomenologischer Aussagewert zukommt. Aus der Beschreibung des

MLD-STZ-Diabetes in den verwendeten transgenen Mauslinien lassen sich dennoch Erkenntnisse über die Pathogenese des MLD-STZ-Diabetes ableiten. Man kann schließen, dass den CD4<sup>+</sup> Zellen keine essentielle Rolle für den Insulinverlust und für das generelle Auftreten einer Insulitis zukommt, dass sie aber für das Ausmaß der Entzündung entscheidend sind. Unterschiede in der Häufigkeit von Insulitiden zwischen CD4-defizienten Tieren und CD4-defizienten Tieren mit transgenem DR17 (4.3.2.4) weisen weiterhin auf mögliche Begleiteffekte von Transgenen hin; wobei in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie auf unbekannte Genabschnitte zurückzuführen sind, die das DR17-Allel flankieren. Angesichts der komplexen und bislang nicht vollständig verstandenen Immunpathogenese des menschlichen Diabetes würde die Aufklärung solcher Phänomene womöglich auch zum Verständnis des menschlichen Typ 1 Diabetes beitragen. Für die zukünftige Verwendung der CD4/DR17-Maus in der Erprobung von therapeutischen Konzepten im MLD-STZ-Diabetes-Modell ist aufgrund der genetischen Heterogenität eine Rückkreuzung auf einen STZ-sensitiven Inzuchtstamm, wie z.B. die C57BL/6-Mauslinie, wünschenswert. Dadurch würden Kontrolltiere zur Verfügung stehen, die sich von der CD4/DR17-Maus lediglich in der Expression der Transgene unterscheiden.

## 6. Zusammenfassung

Thure Adler

### **Der Streptozotozin-induzierte Diabetes in der transgenen CD4/DR17-Maus**

Aus dem Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät

und dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

80 Seiten, 24 Abbildungen, 20 Tabellen, 217 Literaturangaben

Die Verwendung transgener Tiere, die humane Moleküle exprimieren, gewinnt zunehmend an Bedeutung bei der Erforschung der Funktionen solcher Moleküle in Krankheitsprozessen und bei der experimentellen Erprobung neuartiger Therapieverfahren, in denen solche Moleküle die Zielstrukturen darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die CD4/DR17-Maus, welche das humane CD4- und das DR17-Molekül exprimiert, im MLD-STZ-induzierten Diabetes, einem Tiermodell für den Typ 1 Diabetes, eingesetzt. Die funktionelle Beteiligung der Transgene wurde durch einen Vergleich mit Segreganten untersucht, denen die Transgene teilweise fehlen. Als klinische Parameter sind Blutglukose und Glukosetoleranz erfaßt worden, histopathologisch wurden Insulitis und Insulingehalt der Inselzellen bestimmt. Ferner wurde getestet, ob sich durch Verabreichung von monoklonalen Antikörpern, die gegen das transgene hCD4- oder gegen das CD8-Molekül gerichtet sind, dieser STZ-induzierte Diabetes beeinflussen läßt. Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Immunfluoreszenzanalyse von Blutzellen wurde zusätzlich überprüft, ob Veränderungen auf T-Zellen hinsichtlich der Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD71 während des STZ-induzierten Diabetes auftreten.

Es wurde gezeigt, dass die CD4/DR17-transgene Maus nach der Behandlung mit mehrfachen subdiabetogenen Dosen von Streptozotozin eine transiente Hyperglykämie entwickelt, die mit einer verringerten Glukosetoleranz sowie Insulitiden und einem Rückgang des Insulingehaltes in den Langerhans'schen Inseln einhergeht. Vergleiche mit Segreganten zeigen, dass die Expression beider transgener Merkmale zur maximalen Ausprägung einer schwergradigen Insulitis beiträgt. Die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen das transgene hCD4-Molekül nach Beginn der STZ-Behandlung hat den Diabetes nicht wirkungsvoll verzögert. Dagegen milderte eine Behandlung mit Antikörpern, die gegen das CD8-Molekül gerichtet sind, den Diabetesverlauf. Während des STZ-Diabetes veränderte sich die Expression von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten des peripheren Blutes nicht signifikant.

Die Arbeit belegt, dass die CD4/DR17-Maus suszeptibel gegenüber der Induktion eines experimentellen Diabetes mit mehrfachen subdiabetogenen Dosen von Streptozotocin ist. Die transgenen Moleküle hCD4 und DR17 sind dabei am Krankheitsprozeß beteiligt.

## 6.1. Summary

Thure Adler

### **The streptozotocin-induced diabetes in the transgenic CD4/DR17 mouse**

From the Institute of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine

and the Institute of Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Faculty of Medicine,  
University of Leipzig

80 pages, 24 figures, 20 tables, 217 references

Today, transgenic animals that express human molecules are getting important tools in functional studies and experimental, therapeutical attempts, that target these molecules. In this study, the CD4/DR17 mouse expressing the human CD4 and the human DR17 molecules and with a defective murine CD4 gene, was used in the multiple low-dose streptozotocin-induced (MLD-STZ) diabetes model, a model for type 1 diabetes. The functional involvement of the transgenic molecules in the development of the MLD-STZ-diabetes was analysed by comparing CD4/DR17 mice and segregants that lack one or more of the transgenes. The described parameters included the measurement of blood glucose levels and oral glucose tolerance tests, histopathologically grading of insulinitis and determination of the content of insulin in pancreatic islets by immunohistological methods. In addition, the model was used to test the potential therapeutic effect of the administration of monoclonal antibodies against hCD4 or CD8. Furthermore, alterations of the expression of the activation markers CD25, CD69 and CD71 during the experimentally induced diabetes has been measured by FACS analysis.

The study shows, that CD4/DR17 mice develop a transient hyperglycemia after MLD-STZ treatment, accompanied by a reduced tolerance to oral glucose, insulinitis and the reduction of the content of insulin in the pancreatic islets. The full incidence of insulinitis requires the expression of both transgenes. The treatment performed with monoclonal antibodies against the transgenic hCD4 after STZ-treatment could not meliorate the diabetic course, while the treatment with anti CD8 antibodies moderated the diabetic process. After STZ-treatment the expression of activation marker of peripheral T-cells did not alter significantly.

Thus, the CD4/DR17 mouse is shown to be susceptible to the induction of experimental diabetes with MLD-STZ. The transgenic molecules CD4 and DR17 are involved in the pathogenesis of the disease.

## 7. Literaturverzeichnis

ABLAMUNITS V., D. ELIAS u. I. R. COHEN (1999)

The pathogenicity of islet-infiltrating lymphocytes in the non-obese diabetic (NOD) mouse.  
*Clin. Exp. Immunol.* *115*, 260-7.

ABRAHAM, R. S., Y. C. KUDVA, S. B. WILSON, J. L. STROMINGER u. C. S. DAVID (2000)

Co-expression of HLA DR3 and DQ8 results in the development of spontaneous insulinitis and loss of tolerance to GAD65 in transgenic mice.  
*Diabetes* *49*, 548-54.

AMRANI, A., J. VERDAGUER, S. THIESSEN, S. BOU u. P. SANTAMARIA (2000)

IL-1alpha, IL-1beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4 (+) T lymphocytes.  
*J. Clin. Invest.* *105*, 459-68.

ANDERSSON, A. (1979)

Islet implantation normalises hyperglycaemia caused by streptozotocin-induced insulinitis. Experiments in mice.  
*Lancet* *1*, 581-4.

BAEKESKOV, S., J. KANAANI, J. C. JAUME u. S. KASH (2000)

Does GAD have a unique role in triggering IDDM?  
*J. Autoimmun.* *15*, 279-86.

BALASA, B., J. D. DAVIES, J. LEE, A. GOOD, B. T. YEUNG u. N. SARVETNICK (1998)

IL-10 impacts autoimmune diabetes via a CD8+ T cell pathway circumventing the requirement for CD4+ T and B lymphocytes.  
*J. Immunol.* *161*, 4420-7.

BALDARI, C. T., M. M. DI SOMMA, E. MILIA, M. BERGMAN u. J. L. TELFORD (1995)

Interactions between the tyrosine kinases p56lck, p59fyn and p50csk in CD4 signaling in T cells.  
*Eur. J. Immunol.* *25*, 919-25.

BEATTIE, G., R. LANNOM, J. LIPSICK, N. O. KAPLAN u. A. G. OSLER (1980)

Streptozotocin-induced diabetes in athymic and conventional BALB/c mice.  
*Diabetes* *29*, 146-50.

BINGLEY, P. J., E. BONIFACIO, A. J. WILLIAMS, S. GENOVESE, G. F. BOTTAZO u. E. A. GALE (1997)

Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers.  
*Diabetes* *46*, 1701-10.

BIDDISON, W.E., P. E. RAO, M. A. TALLE, G. GOLDSTEIN u. S. SHAW (1984)

Possible involvement of the T4 molecule in T cell recognition of class II HLA antigens. Evidence from studies of CTL-target cell binding.  
*J. Exp. Med.* *159*, 783-97.

BLUE, M. L. u. S. I. SHIN (1984)

Diabetes induction by subdiabetogenic doses of streptozotocin in BALB/cBOM mice. Noninvolvement of host B-lymphocyte functions.  
*Diabetes* *33*, 105-10.

- BOITARD, C., R. YASUNAMI, M. DARDENNE u. J. F. BACH (1989)  
T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice.  
*J. Exp. Med.* 169, 1669-80.
- BONNEVIE-NIELSEN, V., M. W. STEFFES u. A. LERNMARK (1981)  
A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin.  
*Diabetes* 30, 424-9.
- BRADLEY, L. M., V. C. ASENSIO, L. K. SCHIOETZ, J. HARBERTSON, T. KRAHL, G. PATSTONE, N. WOOLF, I. L. CAMPBELL u. N. SARVETNICK (1999)  
Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes.  
*J. Immunol.* 162, 2511-20.
- BURKART, V., Z. Q. WANG, J. RADONS, B. HELLER, Z. HERCEG, L. STINGL, E. F. WAGNER u. H. KOLB (1999)  
Mice lacking the poly (ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozotocin.  
*Nat. Med.* 5, 314-9.
- BUSCHARD, K u. J. RYGAARD (1977)  
Passive transfer of streptozotocin induced diabetes mellitus with spleen cells.  
*Acta path. microbiol. scand. Sect. C* 85, 469-472.
- BUSCHARD, K., N. HASTRUP u. J. RYGAARD (1983)  
Virus-induced diabetes mellitus in mice and the thymus-dependent immune system.  
*Diabetologia* 24, 42-6.
- BÜYÜKDEVİRİM, A. S. (1994)  
Islet Pathology in Streptozotocin-induced Auto-immune Diabetic Mice: new insights into clinical practice.  
*Diabete Metabolisme* 20, 87-94.
- CALCINARO, F., G. GAMBELUNGHE u. K. J. LAFFERTY (1997)  
Protection from autoimmune diabetes by adjuvant therapy in the non-obese diabetic mouse: The role of interleukin-4 and interleukin-10.  
*Immunology and Cell Biology* 75, 467-71.
- CAMPBELL, I. L., L. OXBROW, M. KOULMANDA u. L. C. HARRISON (1988)  
IFN-gamma induces islet cell MHC-antigens and enhances autoimmune, streptozotocin-induced diabetes in the mouse.  
*J. Immunol.* 140, 1111-6.
- CARDINAL, J. W., D. J. ALLAN u. D. P. CAMERON (1998)  
Differential metabolite accumulation may be the cause of strain differences in sensitivity to streptozotocin-induced beta cell death in inbred mice.  
*Endocrinology* 139, 2885-91.
- CHAO, C. C., H. K. SYTWU, E. L. CHEN, J. TOMA u. H. O. MC DEVITT (1999)  
The role of MHC-class II molecules in susceptibility to type I diabetes: identification of peptide epitopes and characterization of the T cell repertoire.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 9299-304.

- CHARLTON, B., A. BACELJ, R. M. SLATTERY u. T. E. MANDEL (1989)  
Cyclophosphamide-induced diabetes in NOD/WEHI mice. Evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes mellitus.  
*Diabetes* 38, 441-7.
- CHARLTON, B. u. T. E. MANDEL (1989)  
Recurrence of insulinitis in the NOD mouse after early prolonged anti-CD4 monoclonal antibody treatment.  
*Autoimmunity* 4, 1-7.
- CHOQUET-KASTYLEVSKY, G., R. TEDONE, M. T. DUCLUZEAU, J. KEHREN, J. F. NICOLAS u. J. DESCOTES (2000)  
The popliteal lymph node response to streptozotocin is under type 1, MHC-class-I restricted, CD8(+) T-cell control.  
*Toxicology* 146, 73-82.
- CHOUDHURI, K. u. D. VERGANI (1998)  
MHC-restriction to T-cell autoaggression: an emerging understanding of IDDM pathogenesis.  
*Diabetes Metab. Rev.* 14, 285-301.
- COCKFIELD, S., V. RAMASSAR, J. URMSON u. P. HALLORAN (1989)  
Multiple low dose streptozotocin induces systemic MHC-expression in mice by triggering T cells to release IFN-gamma.  
*J. Immunol.* 142, 1120-8.
- CONRAD, B., R. N. WEISSMAHR, J. BONI, R. ARCARI, J. SCHUPBACH u. B. MACH (1997)  
A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes.  
*Cell* 90, 303-13.
- CRESSWELL, P. (1994)  
Assembly, transport, and function of MHC-class II molecules.  
*Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-93.
- DARBY, C. R., K. HAMANO u. K. J. WOOD (1993)  
Purification of monoclonal antibodies from tissue culture medium depleted of IgG.  
*J. Immunol. Methods* 159, 125-9.
- DAVIES, J. L., Y. KAWAGUCHI, S. T. BENNETT, J. B. COPEMAN, H. J. CORDELL, L. E. PRITCHARD, P. W. REED, S. C. GOUGH, S. C. JENKINS u. S. M. PALMER (1994)  
A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes.  
*Nature* 371, 130-6.
- DAVISSON, M. T. (1996)  
Rules for nomenclature of inbred strains.  
*Aus: Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, M. F. LYON, S. RASTAN u. S. D. M. BROWN (Hrsg.), 3. Auflage, Vol. 2, Oxford University Press, Oxford, 1532-1536.
- DAYER-METROZ, M. D., M. KIMOTO, S. IZUI, P. VASSALLI u. A. E. RENOLD (1988)  
Effect of helper and/or cytotoxic T-lymphocyte depletion on low-dose streptozotocin-induced diabetes in C57BL/6J mice.  
*Diabetes* 37, 1082-9.

- DE MARIA, R. u. R. TESTI (1998)  
Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ- specific autoimmunity.  
*Immunol. Today* 19, 121-5.
- DELANEY, C. A., D. PAVLOVIC, A. HOORENS, D. G. PIPELEERS u. D. L. EIZIRIK (1997)  
Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells.  
*Endocrinology* 138, 2610-4.
- DILTS, S. M. u. K. J. LAFFERTY (1999)  
Autoimmune diabetes: the involvement of benign and malignant autoimmunity.  
*J. Autoimmun.* 12, 229-32.
- ELIAS, D., H. PRIGOZIN, N. POLAK, M. RAPOPORT, A. W. LOHSE u. I. R. COHEN (1994)  
Autoimmune diabetes induced by the beta-cell toxin STZ. Immunity to the 60-kDa heat shock protein and to insulin.  
*Diabetes* 43, 992-8.
- ELIAS, D., H. MARCUS, T. RESHEF, V. ABLAMUNITS u. I. R. COHEN (1995)  
Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein.  
*Eur. J. Immunol.* 25, 2851-7.
- FACCHINETTI, A., M. PANOZZO, P. PERTILE, L. TESSAROLLO u. G. BIASI (1992)  
In vivo and in vitro death of mature T cells induced by separate signals to CD4 and alpha beta TCR.  
*Immunobiology* 185, 380-9.
- FALCONE, M., J. LEE, G. PATSTONE, B. YEUNG u. N. SARVETNICK (1998):  
B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in non-obese diabetic mice.  
*J. Immunol.* 161, 1163-8.
- FAVEEUW, C., M. C. GAGNERAULT, G. KRAAL u. F. LEPAULT (1995)  
Homing of lymphocytes into islets of Langerhans in prediabetic non-obese diabetic mice is not restricted to autoreactive T cells.  
*Int. Immunol.* 7, 1905-13.
- FERNANDEZ, A., L. C. KING, Y. GUZ, R. STEIN, C. V. WRIGHT u. G. TEITELMAN (1997)  
Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets.  
*Endocrinology* 138, 1750-1762.
- FISCHER, J. (Hrsg.) (1994)  
Veterinärmedizinische Endokrinologie.  
G. Fischer Verlag, Jena. 3. Auflage.
- FLECHNER, I., H. MUNTEFERING, Y. SMADJA u. Z. LARON (1984)  
Immunomodulation of streptozotocin-induced diabetes in mice by a lipopolysaccharide.  
*Diabetes Res.* 1, 231-2.
- FLODSTROM, M., B. TYRBERG, D. L. EIZIRIK u. S. SANDLER (1999)  
Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes.  
*Diabetes* 48, 706-13.

- FOULIS, A. K., M. MCGILL u. M. A. FARQUHARSON (1991)  
Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man. Macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells.  
*J. Pathol.* *165*, 97-103.
- FOWELL, D. u. D. MASON (1993)  
Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential.  
*J. Exp. Med.* *177*, 627-36.
- FREIESLEBEN DE BLASIO, B., P. BAK, F. POCIOT, A. E. KARLSEN u. J. NERUP (1999)  
Onset of type 1 diabetes: a dynamical instability.  
*Diabetes* *48*, 1677-85.
- FRIDAY, R. P., M. TRUCCO u. M. PIETROPAOLO (1999)  
Genetics of Type 1 diabetes mellitus.  
*Diabetes Nutr. Metab.* *12*, 3-26.
- GALE, E. A. M. u. P. J. BINGLEY (1994)  
Can we prevent IDDM?  
*Diabetes Care* *17*, 339
- GEPTS, W. (1965)  
Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus.  
*Diabetes* *14*, 619-33.
- GEPTS, W. u. D. TOUSSAINT (1967)  
Spontaneous diabetes in dogs and cats. A pathological study.  
*Diabetologia* *3*, 249-65.
- GEPTS, W. u. P. M. LECOMPTE (1981)  
The pancreatic islets in diabetes.  
*Am. J. Med.* *70*, 105-15.
- GESSL, A. u. W. WALDHÄUSL (1998)  
Increased CD69 and Human Leukocyte antigen-DR expression on T Lymphocytes in Insulin-Dependent diabetes Mellitus of long standing.  
*J. Clin. Endocrinol. Metabol.* *83*, 2204-09.
- GOLDRATH, A. W., L. BARBER, K. E. CHEN u. S. E. ALTERS (1995)  
Differences in Adhesion Markers, Activation Markers, and TcR in Islet infiltrating vs. peripheral Lymphocytes in the NOD mouse.  
*J. Autoimmun.* *8*, 209-220.
- GOTTHARD, W. (1993)  
Hormone, chemische Botenstoffe.  
Spektrum Akademischer Verlag.
- GRASER, R. T., T. P. DILORENZO, F. WANG, G. J. CHRISTIANSON, H. D. CHAPMAN, D. C. ROOPENIAN, S. G. NATHENSON u. D. V. SERREZE (2000)  
Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions.  
*J. Immunol.* *164*, 3913-8.

- GREINER, D. L., A. A. ROSSINI u. J. P. MORDES (2001)  
Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus.  
*Clin. Immunol. 100*, 134-43.
- GUSE, A. H. , A. YU. TSYGANKOV, B. M. BROKER u. F. EMMRICH (1993)  
Signal transduction in T lymphocytes and monocytes: effects of the anti-CD4 antibody MAX.16H5.  
*Yearbook Immunol. 7*, 175-81.
- HAINES, D. M. u. W.J. PENHALE (1985)  
Autantibodies to pancreatic islet cells in canine diabetes mellitus.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology 8*, 149-156.
- HALUZIK, M. u. J. NEDVIDKOVA (2000)  
The role of nitric oxide in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications.  
*Physiol. Res. 49*, S37-42.
- HAMALAINEN, A. M., M. S. RONKAINEN, H. K. AKERBLUM u. M. KNIP (2000)  
Postnatal elimination of transplacentally acquired disease-associated antibodies in infants born to families with type 1 diabetes. The Finnish TRIGR Study Group.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab. 85*, 4249-53.
- HARRISON, L. C. (1992)  
Islet cell antigens in insulin-dependent diabetes: Pandora' box revisited.  
*Immunol. Today 13*, 348-352.
- HARLAN, D. M., M. A. BARNETT, R. ABE, K. PECHHOLD, N. B. PATTERSON, G. S. GRAYT u. C. H. JUNE (1995)  
Very-low dose streptozotocin induces diabetes in insulin promoter-mB7-1 transgenic mice.  
*Diabetes 44*, 816-23.
- HARTMANN, K., W. BESCH u. H. ZUHLKE (1989)  
Spontaneous recovery of streptozotocin diabetes in mice.  
*Exp. Clin. Endocrinol. 93*: 225-230.
- HAWKINS, T. A., R. R. GALA u. J. C. DUNBAR (1996)  
The lymphocyte and macrophage profile in the pancreas and spleen of NOD mice: percentage of interleukin-2 and prolactin receptors on immunocompetent cell subsets.  
*J. Reprod. Immunol. 32*, 55-71.
- HEROLD, K. C., A. G. MONTAG u. F. W. FITCH (1987)  
Treatment with anti-T-lymphocyte antibodies prevents induction of insulinitis in mice given multiple doses of streptozotocin.  
*Diabetes 36*, 796-801.
- HEROLD, K. C., J. A. BLUESTONE, A. G. MONTAG, A. PARIHAR, A. WIEGNER, R. E. GRESS u. R. HIRSCH (1992)  
Prevention of autoimmune diabetes with nonactivating anti-CD3 monoclonal antibody.  
*Diabetes 41*, 385-91
- HEROLD, K. C., V. VEZYS, Q. SUN, D. VIKTORA, E. SEUNG, S. REINER u. D. R. BROWN (1996)  
Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin.  
*J. Immunol. 156*, 3521-7.

- HEROLD, K. C., E. BAUMANN, V. VEZYS u. F. BUCKINGHAM (1997)  
Expression and immune response to islet antigens following treatment with low doses of streptozotocin in H-2d mice.  
*J. Autoimmun.* *10*, 17-25.
- HERR, R., H. JAHNKE u. A. ARGOUDELIS (1967)  
The structure of streptozotocin.  
*J. of the American Chemical Society* *89*, 4808-4809.
- HIGUCHI, Y., P. HERRERA, P. MUNIESA, J. HUARTE, D. BELIN, P. OHASHI, P. AICHELE, L. ORCI, J. D. VASSALLI u. P. VASSALLI (1992)  
Expression of a tumor necrosis factor alpha transgene in murine pancreatic beta cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes.  
*J. Exp. Med.* *176*, 1719-31.
- HIRAI, H., Y. KAINO, T. ITO u. K. KIDA (2000)  
Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of nonobese diabetic mice.  
*J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* *13*, 91-8.
- HÖGLUND, P., J. MINTERN, C. WALTZINGER, W. HEATH, C. BENOIST u. D. MATHIS (1999)  
Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes.  
*J. Exp. Med.* *189*, 331-9.
- HOWIE, S. E., A. J. SOMMERFIELD, E. GRAY u. D. J. HARRISON (1994)  
Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo: selective loss of CD44- and 'activating' memory T cells.  
*Clin. Exp. Immunol.* *95*, 195-200.
- HUANG, S. W. u. G. E. TAYLOR (1981)  
Immune insulinitis and antibodies to nucleic acids induced with streptozotocin in mice.  
*Clin. Exp. Immunol.* *43*, 425-9.
- HUTCHINGS, P., H. ROSEN, L. O'REILLY, E. SIMPSON, S. GORDON u. A. COOKE (1990)  
Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion- promoting receptor on macrophages.  
*Nature* *348*, 639-42.
- IHM, S. H., K. U. LEE, B. D RHEE u. H. K. MIN (1990)  
Initial role of macrophage in the development of anti-beta-cell cellular autoimmunity in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice.  
*Diabetes Res. Clin. Pract.* *10*, 123-6.
- ITO, M., Y. KONDO, A. NAKATANI u. A. NARUSE (1999)  
New Model of Progressive Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Mice Induced by Streptozotocin.  
*Biol. Pharm. Bull* *22*, 988-9.
- IWAKIRI, R., S. NAGAFUCHI, E. KOUNOUE, M. NAKAMURA, M. KIKUCHI, S. NAKANO u. Y. NIHO (1990)  
Immunohistochemical study of insulinitis induced by multiple low doses of streptozotocin in CD-1 mice.  
*Diabetes Res. Clin. Pract.* *9*, 75-82.

- JANEWAY, C. A. u. P. TRAVERS (1997)  
Immunologie.  
Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- JUN, H. S., C. S. YOON, L. ZBYTNUK, VAN N. ROOIJEN u. J. W. YOON (1999)  
The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.  
*J. Exp. Med.* 189, 347-58.
- KANTWERK, G., S. COBBOLD, H. WALDMANN u. H. KOLB (1987)  
L3T4 and Lyt-2 cells are both involved in the generation of low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice.  
*Clin. Exp. Immunol.* 70, 585-92
- KANTWERK-FUNKE, G., V. BURKART u. H. KOLB (1991)  
Low dose streptozotocin causes stimulation of the immune system and of anti-islet cytotoxicity in mice.  
*Clin. Exp. Immunol.* 86, 266-70.
- KARGES, W. J., J. ILONEN, B. H. ROBINSON u. H. M. DOSCH (1995)  
Self and non-self antigen in diabetic autoimmunity: molecules and mechanisms.  
*Mol. Aspects Med.* 16, 79-213.
- KATZ, J. D., B. WANG, K. HASKINS, C. BENOIST u. D. MATHIS (1993)  
Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis.  
*Cell* 74, 1089-100.
- KAUFMAN, D. L., M. CLARE-SALZLER, J. TIAN, T. FORSTHUBER, G. S. TING, P. ROBINSON, M. A. ATKINSON, E. E. SERCARZ, A. J. TOBIN u. P. V. LEHMANN (1993)  
Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes.  
*Nature* 366, 69-72.
- KAY, T. W., I. L. CAMPBELL, L. OXBROW u. L. C. HARRISON (1991)  
Overexpression of class I major histocompatibility complex accompanies insulinitis in the non-obese diabetic mouse and is prevented by anti-interferon-gamma antibody.  
*Diabetologia* 34, 779-85.
- KIESEL, U., G. FREYTAG, J. BIENER u. H. KOLB (1980)  
Transfer of experimental autoimmune insulinitis by spleen cells in mice.  
*Diabetologia* 19, 516-520.
- KIESEL, U., G. FREYTAG, J. BIENER u. H. KOLB (1981a)  
Strain dependency of the transfer of experimental immune insulinitis in mice.  
*Clin. Exp. Immunol.* 43, 430-33.
- KIESEL, U., B. GREULICH, C. M.-S. MOUMÉ u. H. KOLB (1981b)  
Induction of experimental autoimmune diabetes by low-dose streptozotocin treatment in genetically resistant mice.  
*Immunology Letters* 3, 227-30.
- KILLEEN, N., S. SAWADA u. D. R. LITTMAN (1993)  
Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4.  
*Embo. J.* 12, 1547-53.

KIM, Y. T. u. C. STEINBERG (1984)

Immunologic studies on the induction of diabetes in experimental animals. Cellular basis for the induction of diabetes by streptozotocin.

*Diabetes* 33, 771-7.

KING, C., MUELLER HOENGER, R., MALO CLEARY, M., MURALI-KRISHNA, K., AHMED, R., KING, E. u. N. SARVETNICK (2001)

Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8<sup>+</sup> T-cell responses.

*Nat. Med.* 7, 206-14.

KLINKHAMMER, C., P. POPOWA u. H. GLEICHMANN (1988)

Specific immunity to streptozotocin. Cellular requirements for induction of lymphoproliferation.

*Diabetes* 37, 74-80.

KÖHLER, S., P. UHLMANN, R. BRECHT, M. LANDAU, F. EMMRICH u. R. LAUB (2001)

Anti-human CD4 may differentially regulate the delayed-type hypersensitivity response.

*Immunobiology* 204, 332-333.

KONDO, S., I. IWATA, K. ANZAI, T. AKASHI, S. WAKANA, K. OHKUBO, H. KATSUTA, J. ONO, T. WATANABE, Y. NIHO u. S. NAGAFUCHI (2000)

Suppression of insulinitis and diabetes in B cell-deficient mice treated with streptozotocin: B cells are essential for the TCR clonotype spreading of islet-infiltrating T cells.

*Int. Immunol.* 12, 1075-1083.

KONTIAINEN, S., R. TOOMATH, J. LOWDER u. M. FELDMANN (1991)

Selective activation of T cells in newly diagnosed insulin-dependent diabetic patients: Evidence for heterogeneity of T cell receptor usage.

*Clin. Exp. Immunol.* 83, 347-51.

KRAMER, J. W., S. NOTTINGHAM, J. ROBINETTE, G. LENZ, S. SYLVESTER u. M. I. DESSOUKY (1980)

Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of keeshond dogs.

*Diabetes* 29, 558-65.

KRETOWSKI, A. u. I. KINALSKA (2000)

L-selectin gene T668C mutation in type 1 diabetes patients and their first degree relatives.

*Immunol. Lett.* 74, 225-8.

KUMAR, D., N. S. GEMAYEL, D. DEAPEN, D. KAPADIA, P. H. YAMASHITA, M. LEE, J.H. DWYER, P. ROY-BURMAN, G. A. BRAY u. T. M. MACK (1993)

North-American twins with IDDM. Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin.

*Diabetes* 42, 1351-63.

KURRER, M. O., S. V. PAKALA, H. L. HANSON u. J. D. KATZ (1997)

Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 213-8.

KUSTERER, K., R. LUDWIG, P. HOCHSCHULZ, M. STEGMULLER, J. BOJUNGA u. G. VON MINCKWITZ (1999)

Macrophage and lymphocyte homing in experimental diabetes.

*Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107, S102-7.

LAMPETER, E. F., M. HOMBERG, K. QUABECK, U. W. SCHAEFER, P. WERNET, J. BERTRAMS, H. GROSSE-WILDE, F. A. GRIES u. H. KOLB (1993)

Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation.

*Lancet* 341, 1243-4.

LAMPETER, E. F., I. SEIFERT, D. LOHMANN, J. W. HEISE, J. BERTRAMS, M. R. CHRISTIE, V. KOLB-BACHOFEN u. H. KOLB (1994)

Inflammatory islet damage in patients bearing HLA-DR 3 and/or DR 4 haplotypes does not lead to islet autoimmunity.

*Diabetologia* 37, 471-5.

LAMPETER, E. F., A. KLINGHAMMERN, W. A. SCHERBAUM, E. HEINZE, B. HAASSTERT, G. GIANI u. H. KOLB (1998)

DENIS Group, the Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent type 1 diabetes.

*Diabetes* 47, 980.

LAN, M. S., C. WASSERFALL, N. K. MACLAREN u. A. L. NOTKINS (1996)

IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6367-70.

LAUB, R., M. DORSCH, D. WEDEKIND, D. MEYER, S. SCHRÖDER, J. ERMANN, J. LEHMANN, M. MÄHLER, F. EMMRICH u. H. J. HEDRICH (1998)

Replacement of murine by human CD4 and introduction of HLA-DR17 in mice: A triple-transgenic animal model to study human MHC-II-CD4 interaction in situ.

*J. Exp. Anim. Sci.* 39, 122-135.

LAUB R, K. WENK, M. DORSCH, J. ERMANN u. F. EMMRICH (1999)

Anti human CD4 induces immunological tolerance to tetanus toxoid in HLA-DR17+ huCD4+ muCD4<sup>-</sup> multiple transgenic mice.

*Immunobiology* 200, 462

LAUB, R., M. DORSCH, D. MEYER, J. ERMANN, H. J. HEDRICH u. F. EMMRICH (2000)

A multiple transgenic mouse model with a partially humanized activation pathway for helper T cell responses.

*J. Immunol. Methods* 246, 37-50.

LAUB, R., R. BRECHT, M. DORSCH, U. VALEY, K. WENK u. F. EMMRICH (2002)

Anti-human CD4 induces peripheral tolerance in a human CD4<sup>+</sup>, murine CD4<sup>-</sup>, HLA DR<sup>+</sup> advanced transgenic mouse model.

*J. Immunol.* 269, 2947-55.

LEDBETTER, J. A. u. L. A. HERZENBERG (1979)

Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens.

*Immunol. Rev.* 47, 63-90

LEDOUX, S. P. u. G. L. WILSON (1984)

Effects of streptozotocin on a clonal isolate of rat insulinoma cells.

*Biochem. Biophys. Acta* 804, 387-92.

LEE, K.-U., K. AMANO u. J.-W. YOON (1988)

Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice.

*Diabetes* 37, 989-91.

- LEE, J.-Y., M.-J. KIM, C.-K. MOON u. J. H. CHUNG (1993)  
Degradation products of streptozotocin do not induce hyperglycemia in rats.  
*Biochem. Pharmacology* 46, 2111-3.
- LEHMANN, R. u. G. A. SPINAS (2000)  
Screening, diagnosis and management of diabetes mellitus and diabetic complications.  
*Ther. Umsch.* 57, 12-21.
- LI, L., M. CROWLEY, A. NGUYEN u. D. LO (1999)  
Ability of a nondepleting anti-CD4 antibody to inhibit Th2 responses and allergic lung inflammation is independent of coreceptor function.  
*J. Immunol.* 163, 6557-66.
- LIBLAU, R. S., S. M. SINGER u. H. O. MCDEVITT (1995)  
Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases.  
*Immunol. Today* 16, 34-8.
- LIKE, A. A. u. A. A. ROSSINI (1976)  
Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis.  
*Science* 193, 415-7.
- LIKE, A. A., M. C. APPEL, R. M. WILLIAMS u. A. A. ROSSINI (1978)  
Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice: Morphologic and physiologic studies.  
*Laboratory Investigation* 38, 470-86.
- LO, D., C. R. REILLY, B. SCOTT, R. LIBLAU, H. O. MC DEVITT u. L. C. BURKLY (1993)  
Antigen-presenting cells in adoptively transferred and spontaneous autoimmune diabetes.  
*Eur. J. Immunol.* 23, 1693-8.
- LOHMANN T., R. D. LESLIE u. M. LONDEI (1996)  
T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes.  
*J. Autoimmun.* 9, 385-9.
- LU, W.-T., J.-H. JUANG, B. RAY-SEA HSU u. H.-S. HUANG (1998)  
Effects of high or low dose of streptozotocin on pancreatic islets in C57BL/6 and C.B17-SCID mice.  
*Transplantation Proceedings* 30, 609-10.
- LUDEWIG, B., B. ODERMATT, A. F. OCHSENBEIN, R. M. ZINKERNAGEL u. H. HENGARTNER (1999)  
Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases.  
*Immunol. Rev.* 169, 45-54
- LUCKE, S., B. ZIEGLER, J. M. DIAZ-ALONSO u. H. J. HAHN (1985)  
Eignung spezifischer Färbemethoden für die Bestimmung des  $\beta$ -Zellvolumens im Rattenpankreas mit normalem und reduziertem Insulingehalt.  
*Acta histochem.* 77, 107-16.
- LUKIC, M. L., S. STOSIC-GRUJICIC u. A. SHAHIN (1998)  
Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes.  
*Dev. Immunol.* 6, 119-28.

MAKINO, S., K. KUNIMOTO, Y. MURAOKA, Y. MIZUSHIMA, K. KATAGIRI u. Y. TOCHINO (1980)

Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice.  
*Jikken Dobutsu* 29, 1-13.

MARNER, B., G. BILLE, M. CHRISTY, E. M. DAMSGAARD, S. GARNE, E. HEINZE, S. LARSEN, A. LERNMARK, T. MANDRUP-POULSEN u. J. NERUP (1991)

Islet cell cytoplasmic antibodies in diabetes and disorders of glucose tolerance.  
*Diabet. Med.* 8, 812-6.

MARTIN, S., D. WOLF-EICHBAUM, G. DUINKERKEN, W. A. SCHERBAUM, H. KOLB u. B. O. ROPE (2000)

Development of type 1 diabetes in severe hereditary B lymphocyte deficiency.  
*Immunobiology* 203, 526-527.

MARZIO, R., J. MAUEL u. S. BETZ-CORRADIN (1999)

CD69 and regulation of the immune function.  
*Immunopharm. Immunotoxicol.* 21, 565-82

MORA, C., F. S. WONG, C. H. CHANG u. R. A. FLAVELL (1999)

Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC-class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA- deficient mice.  
*J. Immunol.* 162, 4576-88.

MOSMANN, T. R. u. S. SAD (1996)

The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.  
*Immunol. Today* 17, 138-46.

MYERS, M. A., M. R. LAKS, S. J. FEENEY, T. E. MANDEL, M. KOULMANDA, A. BONE, J. BARLEY, M. J. ROWLEY u. I. R. MACKAY (1998)

Antibodies to ICA512/IA-2 in rodent models of IDDM.  
*J. Autoimmun.* 11, 265-72.

NAKAMURA, M., S. NAGAFUCHI, K. YAMAGUCHI u. R. TAKAKI (1984)

The role of thymic immunity and insulinitis in the development of streptozotocin-induced diabetes in mice.  
*Diabetes* 33, 894-900.

NAKHOODA, A. F., A. A. LIKE, C. I. CHAPPEL, F. T. MURRAY u. E. B. MARLISS (1977)

The spontaneously diabetic Wistar rat.  
*Diabetes* 26, 100-12.

NERUP, J., T. MANDRUP-POULSEN u. J. MOLVIG (1987)

The HLA-IDDM association: implications for etiology and pathogenesis of IDDM.  
*Diabetes Metab. Rev.* 3, 779-802.

NERUP, J., T. MANDRUP-POULSEN, S. HELQVIST, H. U. ANDERSEN, F. POCIOT, J. I. REIMERS, B. G. CUARTERO, A. E. KARLSEN, U. BJERRE u. T. LORENZEN (1994)

On the pathogenesis of IDDM.  
*Diabetologia* 37 Suppl. 2, S82-9.

NICHOLS, W. K., L. L. VANN u. J. B. SPELLMAN (1981)

Streptozotocin effects on T lymphocytes and bone marrow cells.  
*Clin. Exp. Immunol.* 46, 627-32.

NOORCHASHM, H., D. J. MOORE, L. E. NOTO, N. NOORCHASHM, A. J. REED, A. L. REED, H. K. SONG, R. MOZAFFARI, A. M. JEVNIKAR, C. F. BARKER u. A. NAJI (2000)

Impaired CD4 T cell activation due to reliance upon B cell-mediated costimulation in nonobese diabetic (NOD) mice.

*J. Immunol.* 165, 4685-96.

O'BRIEN, B. A., B. V. HARMON, D. P. CAMERON u. D. J. ALLAN (2000)

Nicotinamide prevents the development of diabetes in the cyclophosphamide-induced NOD mouse model by reducing beta-cell apoptosis.

*J. Pathol.* 191, 86-92.

OSCHILEWSKI, M., E. SCHWAB, U. KIESEL, U. OPITZ, K. STUNKEL, V. KOLB-BACHOFEN u. H. KOLB (1986)

Administration of silica or monoclonal antibody to Thy-1 prevents low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice.

*Immunol. Lett.* 12, 289-94.

PAIK, S. G., N. FLEISCHER u. S. I SHIN (1980)

Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6129-33.

PAIK, S. G., M. A. MICHELIS, Y. T. KIM u. S. SHIN (1982 a)

Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. - Inhibition by estrogens and potentiation by androgens.

*Diabetes* 31, 724-9.

PAIK, S. G., M. L. BLUE, N. FLEISCHER u. S. SHIN (1982 b)

Diabetes susceptibility of BALB/cBOM mice treated with streptozotocin. Inhibition by lethal irradiation and restoration by splenic lymphocytes.

*Diabetes* 31, 808-15.

PAKALA, S. V., M. CHIVETTA, C. B. KELLY u. J. D. KATZ (1999)

In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha.

*J. Exp. Med.* 189, 1053-62.

PAPACCIO, G., G. CHIEFFI BACCARI u. V. ESPOSITO (1992)

Immunomodulation of low-dose streptozotocin diabetes in mice reveals that insulinitis is not obligatory for B cell destruction.

*J. Anat.* 181, 403-7.

PAPACCIO, G., F. A. PISANTI, M. V. LATRONICO, E. AMMENDOLA u. M. GALDIERI (2000)

Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide.

*J. Cell. Biochem.* 77, 82-91.

PARISH, N. M., L. BOWIE, S. ZUSMAN HARACH, J. M. PHILLIPS u. A. COOKE (1998)

Thymus-dependent monoclonal antibody-induced protection from transferred diabetes.

*Eur. J. Immunol.* 28, 4362-73.

PAUZA, M. E., A. NGUYEN, T. WOLFE, I. C. HO, L. H. GLIMCHER, M. VON HERRATH u. D. LO (2001)

Variable effects of transgenic c-Maf on autoimmune diabetes.  
*Diabetes* 50, 39-46.

PEAKMAN, M., L. WEN, G. L. MCNAB, P. J. WATKINS, K. C. TAN u. D. VERGANI (1994)

T cell clones generated from patients with type 1 diabetes using interleukin-2 proliferate to human islet antigens.  
*Autoimmunity* 17, 31-9.

PETERSEN, L. D., G. DUINKERKEN, G. J. BRUINING, R. A. W. VAN LIER, R. P. DE VRIES u. B. O. ROEP (1999)

Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus.  
*J. Autoimmun.* 9, 733-737.

PETERSON, J. D. u. K. HASKINS (1996)

Transfer of diabetes in the NOD-scid mouse by CD4 T-cell clones. Differential requirement for CD8 T-cells.  
*Diabetes* 45, 328-36.

PHILLIPS, J. M., S. Z. HARACH, N. M. PARISH, Z. FEHERVARI, K. HASKINS u. A. COOKE (2000)

Nondepleting anti-CD4 has an immediate action on diabetogenic effector cells, halting their destruction of pancreatic beta cells.  
*J. Immunol.* 165, 1949-55.

PROCHAZKA, M., E. H. LEITER, D. V. SERREZE u. D. L. COLEMAN (1987)

Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice.  
*Science* 237, 286-9.

QIN, S. X., M. WISE, S. P. COBBOLD, L. LEONG, Y. C. KONG, J. R. PARNES u. H. WALDMANN (1990)

Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies.  
*Eur. J. Immunol.* 20, 2737-45.

QUINIOU-DEBRIE. M. C, M. DEBRAY-SACHS, M. DARDENNE, P. CZERNICHOW, R. ASSAN, J. F. BACH (1985)

Anti-islet cellular and humoral immunity, T-cell subsets, and thymic function in type 1 diabetes.  
*Diabetes* 34, 373-79.

RAMIYA, V. K., M. S. LAN, C. H. WASSERFALL, A. L. NOTKINS u. N. K. MACLAREN (1997)

Immunization therapies in the prevention of diabetes.  
*J. Autoimmun.* 10, 287-92.

READ S. u. F. POWRIE (2001)

CD4<sup>+</sup>regulatory T cells.  
*Curr. Opin. Immunol.* 13 (6), 644-649.

REDDY S, W. D. u. R. B. ELLIOTT (1995)

Low dose streptozotocin causes diabetes in severe combined immunodeficient (SCID) mice without immune cell infiltration of the pancreatic islets.  
*Autoimmunity* 20, 83-92.

- REDDY, S., M. YOUNG, C. POOLE u. J. ROSS (1998)  
Loss of glucose transporter-2 precedes insulin loss in the nonobese diabetic and the low-dose streptozotocin mouse models: a comparative immunohistochemical study by light and confocal microscopy.  
*Gen. Comp. Endocrinol.* *111*, 9-19.
- REIJONEN, H., T. L. DANIELS, A. LERNMARK u. G. T. NEPOM (2000)  
GAD65-specific autoantibodies enhance the presentation of an immunodominant T-cell epitope from GAD65.  
*Diabetes* *49*, 1621-6.
- ROSSINI, A. A., A. A. LIKE, W. L. CHICK, M. C. APPEL u. G. F. CAHILL (1977 a)  
Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *74*, 2485-89.
- ROSSINI, A. A., M. C. APPEL, R. M. WILLIAMS u. A. A. LIKE (1977 b)  
Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia.  
*Diabetes* *26* (10), 916-20.
- ROSSINI, A. A., R. M. WILLIAMS, M. C. APPEL u. A. A. LIKE (1978)  
Complete protection from low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice.  
*Nature* *276*, 182-4.
- ROTH, R., R. J. GEE u. M. J. MAMULA (1997)  
B lymphocytes as autoantigen-presenting cells in the amplification of autoimmunity.  
*Ann. NY. Acad. Sci.* *815*, 88-104.
- SAKAGUCHI, S (2000)  
Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance.  
*Cell* *101*, 455-8.
- SALOMON, B., D. J. LENSCHOW, L. RHEE, N. ASHOURIAN, B. SINGH, A. SHARPE u. J. A. BLUESTONE (2000)  
B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes.  
*Immunity* *12*, 431-40.
- SANDBERG, J. O., A. ANDERSSON, D. L. EIZIRIK u. S. SANDLER (1994)  
Interleukin-1 receptor antagonist prevents low dose streptozotocin induced diabetes in mice.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* *202*, 543-8.
- SCHADEWALDT, H. (1975)  
The History of Diabetes mellitus.  
Aus: VON ENGELHARDT, D (Herausgeber) (1989)  
*Diabetes - Its medical and cultural history.*  
Springer-Verlag, 1. Aufl., Berlin.
- SCHMIDT, D., J. VERDAGUER, N. AVERILL u. P. SANTAMARIA (1997)  
A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity.  
*J. Exp. Med.* *186*, 1059-75.
- SCHWARTZ, M. u. I. R. COHEN (2000)  
Autoimmunity can benefit self-maintenance.  
*Immunol. Today* *21*, 265-8.

- SCHWIZER, R. W., E. H. LEITER u. R. EVANS (1984)  
Macrophage-mediated cytotoxicity against cultured pancreatic islet cells.  
*Transplantation* 37, 539-44.
- SCOTT, F., D. DANEMAN, J. M. MARTIN (1988)  
Evidence for a critical role of diet in the development of insulin-dependent diabetes mellitus.  
*Diabetes Res.* 7, 153-7.
- SCOTT, B., R. LIBLAU, S. DEGERMANN, L. A. MARCONI, L. OGATA, A. J. CATON, H. O. MCDEVITT u. D. LO (1994)  
A role for non-MHC-genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity.  
*Immunity* 1, 73-83.
- SEEWALDT, S., H. E. THOMAS, M. EJRNAES, U. CHRISTEN, T. WOLFE, E. RODRIGO, B. COON, B. MICHELSEN, T. W. KAY u. M. G. VON HERRATH (2000)  
Virus-induced autoimmune diabetes: most beta-cells die through inflammatory cytokines and not perforin from autoreactive (anti-viral) cytotoxic T-lymphocytes.  
*Diabetes* 49, 1801-9.
- SERREZE, D. V. u. E. H. LEITER (1994)  
Genetic and pathogenic basis of autoimmune diabetes in NOD mice.  
*Curr. Opin. Immunol.* 6, 900-6.
- SERREZE, D. V., C. M. POST, H. D. CHAPMAN, E. A. JOHNSON, B. LU u. P. B. ROTHMAN (2000)  
Interferon-gamma receptor signaling is dispensable in the development of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice.  
*Diabetes* 49, 2007-11.
- SERREZE, D. V., H. D. CHAPMAN, C. M. POST, E. A. JOHNSON, W. L. SUAREZ-PINZON u. A. RABINOVITCH (2001)  
Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: Sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation.  
*J. Immunol.* 166, 1352-1359.
- SHE, J.-X. (1996)  
Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited.  
*Immunol. Today* 17, 323-329.
- SHIMADA, A., Y. IMAZU, S. MORINAGA, O. FUNAE, A. KASUGA, Y. ATSUMI u. K. MATSUOKA (1999)  
T-cell insulinitis found in anti-GAD65+ diabetes with residual beta-cell function. A case report.  
*Diabetes Care* 22, 615-7.
- SHIZURU, J. A., C. TAYLOR-EDWARDS, B. A. BANKS, A. K. GREGORY u. C. G. FATHMAN (1988)  
Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes.  
*Science* 240, 659-62.
- SHIZURU, J. A. u. C. G. FATHMAN (1993)  
Anti-CD4 antibodies in diabetes.  
*Immunol. Ser.; Band: Monoclonal Antibody and peptide therapy in Autoimmune Disease* 59, 237-52.

SONDERSTRUP, G., A. P. COPE, S. PATEL, M. CONGIA, N. HAIN, F. C. HALL, S. L. PARRY, L. H. FUGGER, S. MICHIE u. H. O. MCDEVITT (1999)  
HLA class II transgenic mice: models of the human CD4+ T-cell immune response.  
*Immunol. Rev.* 172, 335-43.

STEGALL, M. D., Z. IOBERMAN, A. OSTROWSKA, M. COULOMBE u. R. G. GILL (1996 a)  
Autoimmune destruction of islet grafts in the NOD mouse is resistant to 15-deoxyspergualin but sensitive to anti-CD4 antibody.  
*J. Surg. Res.* 64, 156-60.

STEGALL, M. D., K. J. LAFFERTY, I. KAM u. R. G. GILL (1996 b)  
Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation.  
*Transplantation* 61, 1272-4.

STRAUSS, G., D. A. VIGNALI, G. SCHONRICH u. G. J. HÄMMERLING (1994)  
Negative and positive selection by HLA-DR3 (DRw17) molecules in transgenic mice.  
*Immunogenetics* 40, 104-8.

SU, X., Q. HU, J. M. KRISTAN, C. COSTA, Y. SHEN, D. GERO, L. A. MATIS u. Y. WANG (2000)  
Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes.  
*J. Immunol.* 164, 2523-32.

SUSCHEK C., K. FEHSEL, K. D. KRONCKE, A. SOMMER u. V. KOLB-BACHOFEN (1994)  
Primary cultures of rat islet capillary endothelial cells. Constitutive and cytokine-inducible macrophagelike nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration.  
*Am. J. Pathol.* 145, 685-95.

TABATABAIE, T., A. M. WALDON, J. M. JACOB, R. A. FLOYD u. Y. KOTAKE (2000)  
COX-2 inhibition prevents insulin-dependent diabetes in low-dose streptozotocin-treated mice.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 699-704.

TANEJA, V. u. C. S. DAVID (1999)  
HLA class II transgenic mice as models of human diseases.  
*Immunol. Rev.* 169, 67-79.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS (1997)  
Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.  
*Diabetes Care* 20, 1183-97.

THOMAS, H. E. u. T. W. KAY (2000)  
Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse.  
*Diabetes Metab. Res. Rev.* 16, 251-61.

TODD, I., C. DAVENPORT, J. H. TOPPING u. P. J. WOOD (1997)  
IgG2a antibodies non-specifically delay the onset of diabetes in NOD-mice.  
*Autoimmunity* 27, 209-11.

- VALLERA, D. A., S. F. CARROLL, S. BRIEF u. B. R. BLAZAR (1992)  
Anti-CD3 immunotoxin prevents low-dose STZ/interferon-induced autoimmune diabetes in mouse.  
*Diabetes* 41, 457-64.
- VERGE, C. F., D. STENGER, E. BONIFACIO, P. G. COLMAN, C. PILCHER, P. J. BINGLEY u. G. S. EISENBARTH (1998)  
Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop.  
*Diabetes* 47, 1857-66.
- VIGNALI, D. A., J. MORENO, D. SCHILLER u. G. J. HÄMMERLING (1992)  
Species-specific binding of CD4 to the beta 2 domain of major histocompatibility complex class II molecules.  
*J. Exp. Med.* 175, 925-32.
- VON MEYENBURG, J. V (1940)  
Über Insulitis bei Diabetes.  
*Schweiz. Med. Wochenschr.* 24, 554-7.
- WANG, Y., L. HAO, R. G. GILL u. K. J. LAFFERTY (1987)  
Autoimmune diabetes in NOD mouse is L3T4 T-lymphocyte dependent.  
*Diabetes* 36, 535-38.
- WANG, Z. u. H. GLEICHMANN (1995)  
Glucose transporter 2 expression: prevention of streptozotocin-induced reduction in beta-cells with 5-thio-D-glucose.  
*Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 103, 83-97.
- WANG, B., A. GONZALEZ, C. BENOIST u. D. MATHIS (1996)  
The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus.  
*Eur. J. Immunol.* 26, 1762-9.
- WEGMANN DALE R., M. NORBURY-GLASER, N. SCHLOOT u. D. DYLAN (1994)  
Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice.  
*J. Autoimmun.* 7, 833-843.
- WEGMANN, D. R. u. G. S. EISENBARTH (2000)  
It's insulin.  
*J. Autoimmun.* 15, 286-91.
- WEIDE, L. G. u. P. E. LACY (1991)  
Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model.  
*Diabetes* 40, 1157-62.
- WEN, L., F. S. WONG, J. TANG, N. Y. CHEN, M. ALTIERI, C. DAVID, R. FLAVELL u. R. SHERWIN (2000)  
In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes.  
*J. Exp. Med.* 191, 97-104.
- WILKIN, T. J. (2001)  
The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes.  
*Diabetologia* 44, 914-922.

- WILSON, G. L. u. E. H. LEITER (1990)  
Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes.  
*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 156, 27-54.
- WILSON, K. u. G. S. EISENBARTH (1990)  
Immunopathogenesis and immunotherapy of type 1 diabetes.  
*Annu. Rev. Med.* 41, 497-508.
- WOLF, J., F. LILLY u. S. I. SHIN (1984)  
The influence of genetic background on the susceptibility of inbred mice to stz diabetes.  
*Diabetes* 33, 567-571.
- WONG, F. S., I. VISINTIN, L. WEN, R. A. FLAVELL u. C. A. JANEWAY (1996)  
CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells.  
*J. Exp. Med.* 183, 67-76.
- WONG, F. S., B. N. DITTEL u. C. A. JANEWAY (1999)  
Transgenes and knockout mutations in animal models of type 1 diabetes and multiple sclerosis.  
*Immunol. Rev.* 169, 93-104.
- WONG, F. S. u. C. A. JANEWAY (1999)  
Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models.  
*Curr. Opin. Immunol.* 11, 643-7.
- YAMADA, K., K. NONAKA, T. HANAFUSA, A. MIYAZAKI, H. TOYOSHIMA u. S. TARUI (1982)  
Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. An observation in nonobese diabetic (NOD) mice.  
*Diabetes* 31, 749-53.
- YAMAMOTO, H., Y. UCHIGATA u. H. OKAMOTO (1981)  
Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP- ribose) synthetase in pancreatic islets.  
*Nature* 294, 284-6.
- YLINEN, L., T. TEROS, A. LIUKAS, P. ARVILOMMI, S. SAINIO-POLLANEN, E. VERAJANKORVA, P. POLLANEN u. O. SIMELL (2000)  
The role of lipid antigen presentation, cytokine balance, and major histocompatibility complex in a novel murine model of adoptive transfer of insulinitis.  
*Pancreas* 20, 197-205.
- YOON, J. W. (1991)  
Role of viruses in the pathogenesis of IDDM.  
*Ann. Med.* 23, 437-45.
- YOON, J. W., R. S. SHERWIN, H. KWON u. H. S. JUN (2000)  
Has GAD a central role in type 1 diabetes?  
*J. Autoimmun.* 15, 273-8.