

Immungenetische Charakterisierung der LEW.1AR1-*iddm* Ratte

- ein Tiermodell des insulinpflichtigen Typ 1 Diabetes mellitus

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.- Biol. Tanja Arndt

geboren am 10. Januar 1979, in Hameln

2008

Referent: Prof. Dr. H.-J. Hedrich

Korreferent: Prof. Dr. S. Lenzen

Tag der Promotion: 27.11.2008

Wissenschaftliche Betreuung: Dr. D. Wedekind, Prof. Dr. M. Tiedge

Die Dissertation wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 705-II „Charakterisierung pathophysiologischer Versuchstiermodelle“ angefertigt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Kurzzusammenfassung

Tiermodelle spielen eine wichtige Rolle bei der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM). Sie erlauben eine detaillierte Untersuchung der Pathomechanismen der β -Zellzerstörung, die aus ethischen Gründen und wegen des langen Zeitverlaufes bei Menschen mit Diabetes nicht durchgeführt werden können. Die am häufigsten für die Untersuchungen des T1DM eingesetzten Nagetiermodelle sind die BB Ratte und die NOD Maus, die jedoch beide Immundefekte aufweisen, die beim humanen T1DM nicht nachgewiesen werden konnten. Im Genom von Mensch, Maus und Ratte finden sich Diabetessuszeptibilitätsregionen, die mit der Manifestation des T1DM assoziiert sind.

Der LEW.1AR1-*iddm* Stamm entstand durch eine Spontanmutation im intra MHC rekombinanten, congenen Rattenstamm LEW.1AR1. Die LEW.1AR1-*iddm* Tiere erkrankten, ausgelöst durch die Mutation, an einem spontanen T1DM. Der Diabetes manifestiert sich um den 60. Lebensstag zu Beginn der Adoleszenz.

Die genetische Analyse einer zweiten Rückkreuzungspopulation [(PARxLEW.1AR1-*iddm*)x LEW.1AR1-*iddm*] konnte 2 der bislang 3 bekannten Suszeptibilitätsloci bestätigen, die für die Diabetesmanifestation in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte eine Rolle spielen. Der *Iddm1* Bereich auf RNO20p12 sowie der *Iddm8* Bereich konnten in dieser Rückkreuzungspopulation ebenfalls identifiziert werden.

Die LEW.1AR1-*iddm* Ratte zeigte nicht nur den Phänotyp des T1DM, sondern auch den eines heterogenen T-Zellgehaltes im peripheren Blut. Die Charakterisierung dieses zweiten Phänotyps zeigte bei den LEW.1AR1-*iddm* Ratten gegenüber dem Hintergrundstamm LEW.1AR1 eine Reduktion der CD3⁺ Zellen, welches auf eine Reduktion in der CD4⁺ T-Zellpopulation zurückzuführen war. Die CD8⁺ T-Zellpopulation war zahlenmäßig unverändert. Diese Veränderungen hatten auch einen direkten Einfluss auf das CD4⁺/CD8⁺ T-Zellverhältnis. Unabhängig von der Veränderung des mittleren Gehaltes der jeweiligen T-Zellpopulation zeigten alle Subpopulationen eine starke Variabilität innerhalb der LEW.1AR1-*iddm* Kohorte im Vergleich zum Hintergrundstamm. Eine Kopplungsanalyse zeigte eine Assoziation mit dem bereits identifizierten *Iddm8* Suszeptibilitätsbereich. Durch zusätzliche KASPar (*Kbiosciences Allele Specific PCR*) Analysen konnte der *Iddm8* Bereich von 40 Mb auf 4 Mb, auf den Bereich RNO1q51, eingegrenzt werden.

Die den T1DM auslösende Autoimmunität kann durch CD4⁺ T-Zellen diabetischer LEW.1AR1-*iddm* Tiere auf athymische LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* Tiere übertragen werden. Die Übertragung von CD8⁺ T-Zellen aus dem Hintergrundstamm auf prädiabetische LEW.1AR1-*iddm* Tiere vermittelt dagegen einen Schutz. Auch diabetische LEW.1AR1-*iddm* Ratten tragen noch funktionsfähiges, regulatorisches Potential innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation. Erstmals konnte der pankreasdrainierende Lymphknoten als Ort der Regulation, sowie eine protektive Wirkungsweise, ein *Shift* von pro- zu antiinflammatorischen Zytokinen, der regulatorischen CD8⁺ T-Zellen beschrieben werden.

Mit der LEW.1AR1-*iddm* Ratte steht somit ein neues Tiermodell des T1DM zur Verfügung, das wesentliche Charakteristika der menschlichen Erkrankung besitzt. Die vorliegende Arbeit liefert Daten zur Genetik und Immunologie, die dieses Tiermodell für die experimentelle Diabetologie sehr interessant machen.

Schlüsselwörter: Diabetes mellitus, Tiermodelle, LEW.1AR1-*iddm* Ratte

Abstract

Animal models of Type 1 diabetes mellitus (T1DM) are crucial in experimental diabetes research. Experimental animal models facilitate the study of the pathogenesis and complications of diabetes, because they permit the evaluation of treatment protocols that are not immediately feasible or ethical in patients with diabetes. At present, the most commonly used diabetic rodent models are the BB rat and the NOD mouse. Both models, however, show significant differences to human T1DM with respect to immunological defects that have not been observed in humans. On the other hand, humans, mice and rats show genomic susceptibility regions which are associated with the manifestation of the T1DM.

The LEW.1AR1-*iddm* rat is a new animal model of human T1DM which arose through a spontaneous mutation within the inbred rat strain LEW.1AR1. The animals develop diabetes around day 60 of life at the beginning of adolescence. No sex differences were found in the diabetic animals. After diabetes onset all animals show the characteristic symptoms of T1DM.

Linkage analysis using a second backcross population [(PARxLEW.1AR1-*iddm*)x LEW.1AR1-*iddm*] could confirm 2 of the 3 already known susceptibility loci, playing a crucial role in diabetes manifestation in the LEW.1AR1-*iddm* rat. The *Iddm1* locus on RNO20p12 as well as the *Iddm8* region could be identified also in this backcross population.

The LEW.1AR1-*iddm* rat shows not only the phenotype of T1DM development but also of a heterogeneous T-cell content in peripheral blood. Characterisation of this additional phenotype showed a reduction of CD3⁺ T-cells in LEW.1AR1-*iddm* rats compared to the background strain LEW.1AR1. This reduction can be traced back to the reduction of CD4⁺ T-cells while CD8⁺ T-cells showed no significant numeric alteration. These changes in T-cell subpopulations had a direct effect on the CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio. Additionally, each T-cell subpopulation showed a strong variability within the LEW.1AR1-*iddm* cohort as compared to the background strain independent from changes of the mean content. Linkage analysis revealed an association between the heterogeneous T-cell content with the already identified susceptibility region *Iddm8*. Through additional KASPar (Kbiosciences Allele Specific PCR) analyses the *Iddm8* region could be narrowed down from 40 Mb to 4 Mb, equating to RNO1q51.

Autoimmune potential causing T1DM can be adoptively transferred by CD4⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into athymic LEW.1AR1-*Whn^{mu}* recipients. In contrast, transfer of CD8⁺ T-cells from the background strain into pre-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats mediated protection against T1DM development. Interestingly, diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats bear functional regulatory potential within the CD8⁺ T-cell population. For the first time the pancreas draining lymph node could be identified as a site of regulation. The underlying mode of action of the regulatory CD8⁺ T-cells is apparently the result of a shift of pro- to anti-inflammatory cytokines.

The LEW.1AR1-*iddm* rat is a new animal model of T1DM that closely resembles human T1DM. This work provides new genetic and immunological data for this new animal model which make it very interesting for experimental diabetes research.

Key words: diabetes mellitus, animal models, LEW.1AR1-*iddm* rat

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung

Abstract

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Definition und Klassifikation des Diabetes mellitus	1
1.2. Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM)	2
1.2.1. Die Genetik des Diabetes mellitus Typ 1	3
1.2.2. Immunologie des T1DM	5
1.3. Tiermodelle des Diabetes mellitus Typ 1	9
1.3.1. Die NOD Maus	10
1.3.2. Die BB Ratte	12
1.3.3. Die KDP Ratte	15
1.3.4. Die LEW.1AR1/Ztm- <i>iddm</i> Ratte	17
1.4. Fragestellung	19
2. Publikationen	21
2.1. The mutation of the LEW.1AR1- <i>iddm</i> rat maps to the telomeric end of RNO1	22
2.2. The mutation of the LEW.1AR1- <i>iddm</i> rat causes not only to type 1 diabetes mellitus development but also to a heterogeneous T-cell content	41
2.3. Prevention of type 1 diabetes development in the LEW.1AR1- <i>iddm</i> rat is mediated by selective CD8 ⁺ T-cell transfer inducing a cytokine shift in the pancreas draining lymph nodes	65
3. Diskussion	92
3.1. Die Genetik des Typ 1 Diabetes mellitus	92
3.1.1. Die genetische Analyse einer zweiten Rückkreuzungspopulation deutet auf eine Lokalisation der Mutation im Diabetessuszeptibilitätslocus <i>Iddm8</i> hin.	94
3.2. Die Immungenetik des Typ 1 Diabetes mellitus	96
3.2.1. Die genetische Analyse beider Rückkreuzungspopulationen auf den Phänotyp „heterogener T-Zellanteil“ deuten auf eine Lokalisation der Mutation im Diabetessuszeptibilitätslocus <i>Iddm8</i> hin.	97
3.2.1.1. T-Zellgehalt in peripheren Blut Lymphozyten (PBL) in diabetischen und nicht diabetischen LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratten und in dem Hintergrundstamm LEW.1AR1	97
3.2.1.2. CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Verhältnis in T-Zellen (PBL) in der LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratte und dem Hintergrundstamm LEW.1AR1	99
3.2.1.3. Vererblichkeit der Variabilität des T-Zellgehalts	100
3.2.1.4. Genotypisierung des heterogenen T-Zellgehalts	100
3.3. Die Immunologie des Typ 1 Diabetes mellitus	101

3.3.1. Der selektive Transfer ConA stimulierter T-Zellsubpopulationen und dessen Bedeutung bei Induktion oder Prävention des T1DM der LEW.1AR1- <i>iddm</i> Ratte	101
3.3.1.1. Transfer unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen induziert oder verhindert die T1DM Entwicklung.....	102
3.3.1.2. Regulatorisches Potential der T-Zellen, insbesondere der CD8 ⁺ T-Zellen.	104
3.3.1.3. Perspektive	105
4. Zusammenfassung.....	106
5. Anhang	109
5.1. <i>IDDM</i> Gene des humanen Genoms und ihre Lokalisation	109
5.2. Diabetessuszeptibilitätsregion der NOD Maus (<i>Idd</i> Gene) und deren Lokalisation im Genom	110
5.3. Diabetessuszeptibilitätsregionen der BB und KDP Ratte (<i>Iddm</i> Gene) und deren Lokalisation im Genom	111
6. Literaturverzeichnis.....	112
7. Danksagung	128
8. Publikationen.....	130
9. Lebenslauf.....	134
10. Erklärung.....	135

1. Einleitung

1.1. Definition und Klassifikation des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist in den westlichen Industrieländern die bedeutendste Stoffwechselerkrankung (Hauner *et al.* 2003), die grundsätzlich in einen Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus aufgeteilt werden kann. Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) ist charakterisiert durch eine Autoimmunzerstörung der β -Zellen des Pankreas, die zu einem absoluten Mangel an Insulin führt, während der Typ 2 Diabetes mellitus durch eine Insulinresistenz, isoliert oder in Kombination mit einem Sekretionsdefekt der β -Zellen zu einem relativen Insulinmangel führt (Pickup & Williams 2003).

Bereits 1965 wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine Empfehlung zur Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus gegeben (WHO 1965). Diese wurde 1997 von der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (ADA 1997) revidiert, 1999 bestätigt (ADA 1999), und es wurden neue Kriterien zur Klassifikation definiert, die 2000 von der WHO und der Deutschen Diabetes Gesellschaft (Kerner 2001) bestätigt und als Leitlinien übernommen wurden. In Tabelle 1 ist diese neue Klassifikation dargestellt (ADA 1997; Alberti & Zimmet 1998). 2003 wurden noch einmal Änderungen in Bezug auf die Diagnose der Nüchternblutglucose (*impaired fasting glucose (IFG)*) vorgenommen (ADA 2003).

<p>1. Typ 1 Diabetes durch absoluten Insulinmangel oder durch β-Zellzerstörung</p> <p>A. Immunologisch vermittelt</p> <p>B. Idiopathisch</p>
<p>2. Typ 2 Diabetes kann sich von vorwiegender Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken</p>
<p>3. Andere spezifische Diabetes Typen, z.B. genetische Defekte von β-Zellfunktion oder Insulinwirkung; Erkrankung des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, Medikamenten- oder Chemikalien-induziert, Infektionen, usw.</p>
<p>4. Gestationsdiabetes</p>

Tab. 1 Nosologische Klassifikation des Diabetes mellitus nach den ADA Kriterien von 1997 (ADA 1997)

Der Typ 1 Diabetes mellitus macht nach aktuellen Erhebungen 10-15 % (Zimmet *et al.* 2001) aller Diabetesfälle aus, weltweit sind 10-20 Millionen Patienten betroffen. Die Inzidenz des T1DM beträgt in den westlichen Industrieländern ca. 3-5 %. Da 40 % der Patienten vor dem zwanzigsten Lebensjahr erkranken (Lally & Bone 2003), ist der T1DM eine schwere chronische Erkrankung des Kindes- und Jugendalters, die eine lebenslange Insulinsubstitution und strikte Lebensführung erfordert (Joner & Sovik 1989; WHO 1990; Karvonen *et al.* 2000).

1.2. Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM)

Der T1DM ist durch die progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas gekennzeichnet (Atkinson & Eisenbarth 2001). Der Insulinmangel führt zu den klassischen Symptomen Hyperglykämie, Gewichtsverlust, Polydipsie, Polyurie und Ketoazidose (Kerner 2001).

Der T1DM wird durch eine Autoimmunreaktion ausgelöst, welche die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zerstört. Der T1DM tritt beim Menschen vom Kindesalter bis zum jungen Erwachsenenalter auf (Bach 1994; Benoist & Mathis 1997; Eisenbarth 2008). T1DM Erkrankungen werden nicht in den ersten sechs Lebensmonaten beobachtet (Hürter & Lange 1997), danach steigt die Inzidenz jedoch kontinuierlich an und erreicht ein kurzes Zwischenplateau im Alter von ca. fünf bis sieben Jahren. Der Inzidenzgipfel des T1DM liegt zu Beginn der Adoleszenz, bei den Mädchen zwischen 12 und 13 Jahren, bei den Jungen ein bis zwei Jahre später (Hürter & Lange 1997).

Da es sich beim T1DM um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, wird nicht nur Umweltfaktoren wie Chemikalien, Viren und Nahrungsbestandteilen (Akerblom & Knip 1998; Baldeon 2000; Jun & Yoon 2001) ein Einfluss auf die Diabetesentwicklung zugeschrieben. Ein genetischer Hintergrund wird heute allgemein als Faktor der Diabetesentstehung akzeptiert, wobei insbesondere der MHC-Locus von zentraler Bedeutung ist und auch diagnostische Relevanz besitzt (Nerup *et al.* 1974).

Die Autoimmunzerstörung im T1DM kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden (Eisenbarth 2008), an deren Ende ein kompletter Verlust der β -Zellen des Pankreas steht. Nach einer unauffälligen Phase mit normaler Stoffwechselfunktion kommt es zu so genannten „Triggerereignissen“, welche den Autoimmunprozess einleiten. Diese Ereignisse sind vielfältiger Natur. Es können Ernährungs- und Umweltfaktoren, wie z.B. gluten- und kuhmilchhaltige Nahrungsbestandteile, sowie Infektionen (Enteroviren, Coxsackieviren, Rötelviren) eine Rolle spielen (Akerblom & Knip 1998; Baldeon 2000; Jun & Yoon 2001). Diese Triggerereignisse führen zu einer Aktivierung von autoaggressiven Immunzellen, welche die β -Zellen des Pankreas gezielt attackieren. Dabei wird angenommen, dass Umweltfaktoren durch molekulare Mimikry als Superantigene mit β -Zellproteinen interagieren und so die Selektion von autoaggressiven Zellen positiv beeinflussen (Pickup & Williams 2003).

Mit Beginn des Autoimmunprozesses kommt es zu einem progredienten Verlust der β -Zellmasse. In diesem Stadium sind die Patienten mit der Ausnahme von Autoantikörpern

gegen β -Zellbestandteile (ICA/IAA), die im Blut nachgewiesen werden können, klinisch unauffällig (Knip 2002; Pickup & Williams 2003). Nach einem Verlust von mehr als 50 % der β -Zellmasse wird eine gestörte Glukosetoleranz beobachtet, nach einer Zerstörung von mehr als 80 % dann auch erhöhte Nüchternblutglukosekonzentrationen (Knip 2002). Erst zu diesem Zeitpunkt werden die meisten Patienten klinisch diagnostiziert, da die ausgeprägte Hyperglykämie zum typischen diabetischen Syndrom mit Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und allgemeiner körperlicher Schwäche führt. Sind durch die verbleibende β -Zellmasse zum Zeitpunkt der Diagnose noch C-Peptidspiegel im Blut nachweisbar, führt die progrediente Zerstörung der β -Zellen zum kompletten Verlust des körpereigenen Insulins und des C-Peptids. Aus diesem Verlauf heraus wird deutlich, dass zum Zeitpunkt der Diagnose eines T1DM der größte Teil des Autoimmunprozesses bereits abgelaufen ist und die Chancen therapeutischer Interventionen auf die lebenslange Substitution von Insulin begrenzt sind. Dies erklärt, warum Tiermodelle des T1DM eine herausragende Bedeutung für die Charakterisierung der Autoimmunzerstörung haben. Diese Modelle haben wesentlich zum Verständnis der immunologischen Phänomene und der Toxizität von Zytokinen als humorale Immunmediatoren beigetragen.

1.2.1. Die Genetik des Diabetes mellitus Typ 1

Es ist bekannt, dass die Suszeptibilität für die Erkrankung Diabetes mellitus Typ 1 erblich ist. Bei der Manifestation eines humanen T1DM beeinflusst die genetische Suszeptibilität die Entwicklung zu etwa einem Drittel. So liegt die Inzidenz bei eineiigen Zwillingen bei 36 % (Risch 1987; Olmos *et al.* 1988), fällt auf ca. 5 % bei Geschwistern (Degnbol & Green 1978), und liegt bei der kaukasischen Gesamtbevölkerung bei 0,4 % (Krolewski *et al.* 1987). Beim Menschen sind bis heute über 20 *IDDM* Gene identifiziert worden und auch bei den Maus- und Rattenmodellen für den T1DM gibt es eine genetische Komponente. So sind bis jetzt mehr als 25 *Idd* Gene bei der NOD Maus, zwei *Iddm* Gene bei der KDP Ratte und 10 *Iddm* Gene bei der BB Ratte gefunden worden (s. Anhang, Tabellen A1 –A3). Der T1DM ist somit eine multifaktorielle Erkrankung, die polygen vererbt wird.

Nur wenige der menschlichen Suszeptibilitätsregionen sind homolog zu Regionen in den gängigen Nagetiermodellen. Die Suszeptibilitätsregion *IDDM12* des Menschen mit dem assoziierten Gen *CTLA4* ist homolog zum Suszeptibilitätsbereich *Idd5* der Maus. Zwischen dem Menschen und den beiden Rattenmodellen fanden sich bis jetzt keine homologen Suszeptibilitätsregionen außerhalb der MHC Region, welche sowohl in den Tiermodellen als

auch beim Menschen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Suszeptibilität für den T1DM hat.

Die stärkste Assoziation zum T1DM des Menschen findet sich im Suszeptibilitätslocus *IDDM1*, der in die MHC-Region (Haupthistokompatibilitätskomplex) kartiert. Dieser Bereich befindet sich auf Chromosom (HSA) 6 in der Region p21.3. Die MHC Region, auch bezeichnet als HLA (Human Leukocyte Antigen), kodiert für eine Reihe von Zelloberflächenantigenen, die die Antigenpräsentation übernehmen. Der HLA des Menschen wird bei der Ratte als RT1 Komplex und bei der Maus als H2 bezeichnet. Der MHC umfasst eine Region von ca. 4000 kb, besitzt mindestens 220 Gene (Hurt *et al.* 2004) und wird in drei Klassen unterteilt, wobei die Klasse I Region von Maus und Ratte geteilt ist und den MHC II einrahmt. Als Ursache für diese Teilung werden z.B. eine Translokation und/oder Duplikation eines Klasse I Segments in der Entwicklungsgeschichte der Nagetiere diskutiert (Klein & Figueroa 1986). Funktionell gesehen ist die MHC Klasse I für die endogene Peptidpräsentation gegenüber $CD8^+$ T-Zellen verantwortlich. Die biologische Hauptfunktion der MHC Klasse II liegt in der Antigenpräsentation gegenüber $CD4^+$ T-Zellen. Es werden jedoch auch hier weiterhin neue Gene entdeckt und beschrieben, die oftmals keine direkte Funktion bei der Antigenerkennung haben. Ein Grossteil dieser Gene wird als MHC Klasse III klassifiziert.

Die Assoziation zwischen dem MHC und dem T1DM ist durch die vielen Haplotypen, die das Krankheitsrisiko beeinflussen, sehr komplex. Die größte Assoziation findet sich beim Menschen in der MHC Klasse II Region mit den MHC Haplotypen HLA-DRB1*03.DQ2 und 04.DQ8 (Herr *et al.* 2000). Einen protektiven Einfluss in Bezug auf eine Manifestation des T1DM beim Menschen besitzt wahrscheinlich der HLA-DQ6 Haplotyp. Es wird diskutiert, ob dieser Haplotyp zu einer Deletion von autoreaktiven T-Zellen oder zu einem veränderten Aktivierungsgrad der T-Zellen führt, so dass eine Autoimmunreaktion verhindert wird (Thorsby & Ronningen 1992; Sanjeevi 2000). Die strukturellen Unterschiede zwischen den permissiven und protektiven MHC Molekülen resultieren aus Unterschieden in der Antigenpeptidselektivität, der Bindungsaffinität und der Stabilität des HLA Moleküls auf der Zelloberfläche.

Alle anderen *IDDM* Gene im Genom des Menschen, die alle mit der Krankheit assoziiert sind, spielen bei der Manifestation größtenteils nur eine untergeordnete Rolle (Pickup & Williams 2003). Allerdings ist auch das Insulingen (*INS*) ein interessanter Kandidat für ein Diabetessuszeptibilitäts-gen, da die Autoimmunprozesse, die zum T1DM führen,

hochspezifisch für die β -Zellen sind und das Insulin und seine Vorläufer als Autoantigene fungieren können. Beeinflusst wird die Autoimmunität auch durch die Menge des dem Immunsystem präsentierten Antigens (in diesem Fall Insulin). Die Aktivität der β -Zellen spielt daher eine wichtige Rolle und wird an der freigesetzten Menge an Insulin gemessen.

Der predisponierende Polymorphismus der *INS* Region des Menschen (*IDDM2*) ist ein Minisatellit mit einer variablen Anzahl von *Tandem Repeats* 596 bp oberhalb des Translationsstartes des Insulingens. Die Anzahl dieser *Tandem Repeats* nimmt Einfluss auf die Suszeptibilität zur Erkrankung. Eine geringe Wiederholungszahl zwischen 28 und 44 ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für die Manifestation eines T1DM, während eine große Wiederholungszahl zwischen 138 und 159 einen dominanten Schutz ausübt (Bennett *et al.* 1995; Bennett *et al.* 1996; Vafiadis *et al.* 1997; Stead *et al.* 2000). Der *IDDM2* Locus scheint einen Einfluss von 10 % bei familiärer Häufung auf die Entwicklung eines T1DM zu haben (Davies *et al.* 1994). Wie genau der *INS* Polymorphismus das Erkrankungsrisiko beeinflusst, ist jedoch unklar.

1.2.2. Immunologie des T1DM

Die Zerstörung der β -Zellen des Pankreas wird durch zelluläre Elemente des Immunsystems sowie durch proinflammatorische Zytokine vermittelt, die eine zur Apoptose der β -Zellen führende Signalkaskade, bestehend aus Caspasen und anderen proapoptotischen Enzymen, auslösen (Bach 1994; Mandrup-Poulsen 2001; Jörns *et al.* 2005). Als Konsensmodell der β -Zellerstörung hat sich das am Steno Diabetes Center (Gentofte, Dänemark) entwickelte „Kopenhagener“ Modell etabliert (Abb. 2), das das Zusammenspiel von zellulären und humoralen Immunmediatoren bei der β -Zellerstörung beschreibt (Nerup *et al.* 1994). Die Autoimmunzerstörung der β -Zelle beginnt mit einer initialen Attacke der Immunzellen, die zu einer Freisetzung von β -Zellproteinen führt. Diese Proteinfreisetzung kann z.B. direkt durch Viren und Chemikalien, sowie indirekt durch Nahrungsbestandteile wie Gluten (Frisk *et al.* 2008) oder Zytokine initialisiert werden. In diesem Zusammenhang spielt wiederum die genetische Prädisposition der Patienten eine wichtige Rolle (Hürter & Lange 1997).

Die freigesetzten β -Zellproteine werden von Makrophagen oder dendritischen Zellen aufgenommen und nach Opsonisierung, d.h. nach Bedeckung der Oberfläche mit Antikörpern und Faktoren des Komplementsystems, den anderen Immunzellen präsentiert (über so genannte antigenpräsentierende Zellen, APC). An diesem Prozess sind als Mediatoren verschiedenste Zytokine und Chemokine wesentlich beteiligt. Zusätzlich wird die Sekretion von IL-1 β und TNF- α durch die APCs in einer IFN- γ -bedingten Feedback-Stimulation

verstärkt. Die Präsentation der β -Zellantigene führt zu einer Aktivierung spezifischer T-Helfer-Zellen (Th), die das Antigen über MHC-Klasse II Moleküle präsentieren. Auch die T-Helferzellen sezernieren Zytokine, die zum einen die Zytokinproduktion der anderen antigenpräsentierenden Zellen weiter anregen. Zum anderen führt diese hohe Konzentration von Zytokinen zur Produktion von freien Radikalen wie Stickstoffmonoxid (NO), das durch das Enzym (induzierbare) Nitroxidsynthase (iNOS) synthetisiert wird, und Superoxidanionen (O_2^-) in den Immunzellen und später in den β -Zellen des Pankreas (Lenzen 2008b). Dieser *Circulus vitiosus* aus Antigenfreisetzung und Antigenpräsentation verstärkt sich selbst, wird jedoch durch die β -Zellmasse letztlich limitiert. Die freigesetzten Zytokine initiieren apoptotische Signalwege, die zur Zerstörung der β -Zellen führen. Das Ergebnis dieses Prozesses sind Langerhanssche Inseln, die keine β -Zellen mehr enthalten und als so genannte „End-Stage Islets“ bezeichnet werden (Nerup *et al.* 1994).

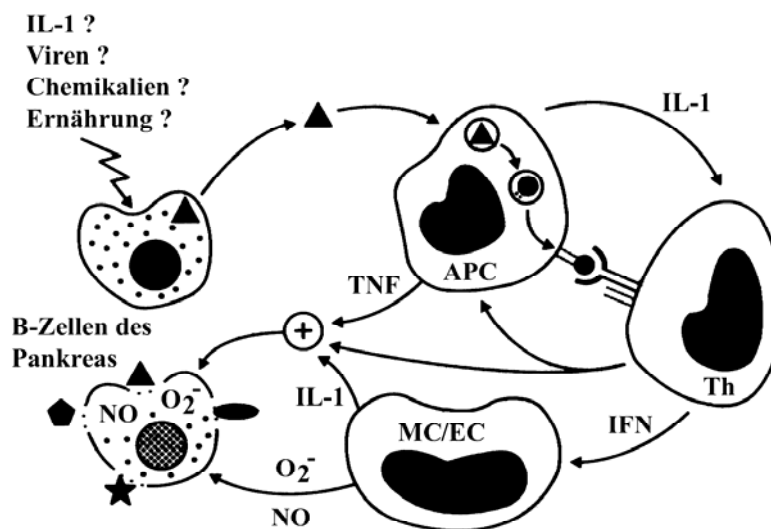


Abb. 1 Das Kopenhagenmodell nach Nerup *et al.* (1994) zeigt schematisch die Zerstörung der β -Zellen durch Autoimmunprozesse.

Eine genetische Prädisposition, kombiniert mit exogenen Triggern wie Infektionen oder Nahrungsbestandteilen, führt zu einer Schädigung der β -Zelle und zur Initiierung der β -Zellzerstörung. Die dabei freigesetzten β -zellspezifischen Proteine werden durch Antigenpräsentierende Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und präsentiert. Im Stadium der bereits infiltrierten Inseln werden von Makrophagen, T-Zellen und anderen Immunzellen die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ sezerniert. Die Aktivierung der T-Zellen stimuliert die Sekretion von weiteren Zytokinen. In der Insel treten CD8⁺-T-Zellen in einen direkten Kontakt mit den MHC I-Molekülen, welche Antigene tragen, die direkt aus der β -Zelle stammen. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von Perforin und Granzym B, was eine Apoptose-Kaskade zur Folge hat. Zusätzlich wird insbesondere IFN- γ sezerniert, was die Produktion von MHC-I-Rezeptoren und somit die Präsentation von intrazellulär abgebauten Peptiden verstärkt. Als Folge der hohen lokalen Konzentrationen der proinflammatorischen wird die Zerstörung von β -Zellen des Pankreas durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und NO aus Makrophagen (MC) und β -Zellen des Pankreas potenziert. Das Ergebnis dieser Vorgänge ist die Selbstverstärkung des eingeleiteten Autoimmunprozesses bis zur völligen Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen.

Der Typ 1 Diabetes mellitus resultiert aus einer bis heute nur wenig verstandenen Interaktion zwischen genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und dem Immunsystem. Der Prozess der Autoimmunität, der zur Diabetesmanifestation führt, ist im Wesentlichen durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vermittelt (Pickup & Williams 2003).

Um die Auslöser dieser Autoimmunität experimentell zu untersuchen, werden verschiedene Methoden angewandt. So konnte durch den Einsatz von Polyinositol-Polycytidylsäure (Poly I:C) die autoimmune β -Zellzerstörung in verschiedenen T1DM Tiermodellen charakterisiert werden. Dieses synthetische, doppelsträngige RNA Molekül imitiert eine virale Infektion und stimuliert dadurch das angeborene Immunsystem (Liu *et al.* 2001). Poly I:C ist außerdem durch die Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren ein potenter Aktivator der Zytokine IFN- α und IFN- β (Sobel *et al.* 1994; Tough *et al.* 1996). Der Effekt von Poly I:C auf die Entwicklung eines T1DM ist von vielen entscheidenden Faktoren abhängig. Dazu zählen z.B. die Tierart, der MHC Haplotyp, der Genotyp und das Behandlungsschema. So beschleunigten hohe Poly I:C Dosen (10 μ g/g KG) die Entwicklung des T1DM bei BB Ratten (Sobel *et al.* 1992), während niedrige Dosen (5 μ g/g KG) protektiv wirkten. Dieser protektive Effekt konnte auch bei LEW.1AR1-*iddm* Tieren gezeigt werden (Wedekind *et al.* 2005). Im NOD Mausmodell zeigte Poly I:C ebenfalls eine protektive Wirkung gegenüber einer Autoimmunzerstörung (Serreze *et al.* 1989). Dennoch zeigen BALB/c Mäuse bei einer Behandlung mit Poly I:C und Insulin eine Insulinitis, die augenscheinlich durch eine spezifische Inselzellautoimmunität entsteht (Moriyama *et al.* 2002).

Im Fokus der Forschung steht vor allem das zelluläre Immunsystem. Seine Rolle kann durch den Einsatz von adoptiven Transfersversuchen weiter untersucht werden. Hierfür wurden Concanavalin A (ConA) stimulierte T-Zellen oder auch T-Zellsubpopulationen transferiert. So wurden mit der diabetessuszeptiblen BB-DP Ratte Experimente durchgeführt, die zum Verlust bzw. zur Inaktivierung von T-Zellsubpopulationen führten. Ebenso wurden bestimmte T-Zellsubpopulationen von diabetesresistenten, histokompatiblen Spendertieren übertragen (Like *et al.* 1979; Naji *et al.* 1979; Naji *et al.* 1981; Like *et al.* 1982; Laupacis *et al.* 1983; Like *et al.* 1983; Rossini *et al.* 1983; Rossini *et al.* 1984a; Rossini *et al.* 1984b). Nicht nur die Übertragung von T-Zellen, sondern auch die Übertragung von Thymozyten als Vorläufer der T-Zellen und Knochenmark, als Vorläufer von Thymozyten können Diabetes transferieren. Diese Übertragbarkeit des T1DM durch Knochenmarkstransplantationen konnte ungewollt auch beim Menschen bestätigt werden, da Knochenmarksspenden von an T1DM erkrankten Personen die Erkrankung auch in den Empfängern auslöste (Lampeter *et al.* 1998). Für die Entstehung des T1DM ist es unerheblich, ob T-Zellen entfernt, inaktiviert oder substituiert

werden. Entscheidend ist das Gleichgewicht bzw. Ungleichgewicht zwischen autoaggressiven und regulatorischen T-Zellen (Hori *et al.* 2003b). Die Elimination der autoaggressiven T-Zellen erfolgt in der Regel vor allem über die klonale Deletion im Thymus. Der Prozess, der zur Elimination autoaggressiver T-Zellen in der Peripherie führt, ist noch so gut wie unbekannt. Es werden jedoch zwei Mechanismen diskutiert. Zum einen eine funktionelle Inaktivierung autoaggressiver T-Zellen (klonale T-Zell Anergie), zum anderen die aktive Suppression der autoaggressiven T-Zellen durch antagonistische, regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (Fowell & Mason 1993). In diesem Zusammenhang wird auch diskutiert, dass eine leichte Reduktion der Lymphozyten im Blut das Risiko für eine Autoimmunkrankheit erhöhen kann, da es aufgrund der homöostatischen Proliferation, welche MHC anhängig ist, zu einer bevorzugten Bildung inselnspezifischer T-Zellen kommen kann (Marleau & Sarvetnick 2005; Krupica *et al.* 2006).

In selektiven Transferversuchen wurde festgestellt, dass es sich bei den T_{reg} -Zellen um eine Subpopulation der $CD4^+$ T-Zellen handelt (Hori *et al.* 2003b). Natürlicherweise sind T_{reg} -Zellen in der $CD25^+CD4^+$ T-Zellsubpopulation angereichert. Der CD25 Oberflächenmarker beschreibt die IL-2 Rezeptor- α -Kette (CD25), die auf den T_{reg} -Zellen hochspezifisch exprimiert wird (Sakaguchi *et al.* 1995). Ergänzend dazu wird FoxP3 (*forkhead box P3*) als weiterer hochspezifischer Marker für die Differenzierung und Funktion von T_{reg} diskutiert (Fontenot *et al.* 2003; Hori *et al.* 2003a; Khattri *et al.* 2003), da er im Gegensatz zu CD25 nicht auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. FoxP3 gehört zu der Familie der diversen *forkhead* Transkriptionsfaktoren. Neueste Untersuchungen zeigten, dass regulatorisches Potential auch in $CD8^+$ T-Zellen zu finden ist. Diese Zellen haben gleiche Merkmale wie bereits bekannte regulatorische $CD4^+$ T-Zellen (Smith & Kumar 2008).

Die Rolle der T_{reg} -Zellen wurde auch in Tiermodellen für spontane Autoimmunerkrankungen demonstriert. In lymphopenischen BB Ratten konnte durch den Transfer von $CD4^+$ T-Zellen aus der diabetesresistenten BB-Sublinie eine Diabetesmanifestation verhindert werden (Mordes *et al.* 1987). Gleichzeitig kann eine Depletion von $RT6^+$ T-Zellen einen T1DM im diabetesresistenten BB/W (BB-DR) Stamm auslösen (Greiner *et al.* 1987).

Bei den NOD Mäusen konnte die Entwicklung des T1DM beim Transfer von diabetogenen T-Zellen durch den Cotransfer von peripheren $CD4^+$ T-Zellen oder Thymocyten junger, prädiabetischer NOD Spendertiere verhindert werden.

Die $CD25^+CD4^+$ T-Zellen von Mensch und Maus zeigen keine funktionellen Unterschiede. Wenn man davon ausgeht, dass die Elimination der T_{reg} -Zellen bei Tieren eine

Autoimmunerkrankung auslösen kann, so ist es denkbar, dass Veränderungen der T_{reg}-Zellpopulation ein Auslöser für Autoimmunerkrankungen beim Menschen sein können (Sakaguchi & Sakaguchi 1994; Sakaguchi 2000). Genetische Veränderungen oder Umwelteinflüsse können die Funktion und Entwicklung der T_{reg}-Zellen beeinflussen. Das Vorkommen der daraus resultierenden T_{reg}-Verminderung in Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition (z.B. MHC Hochrisikohaplotyp) könnte zur Manifestation einer Autoimmunerkrankung führen (Sakaguchi & Sakaguchi 1994; Sakaguchi *et al.* 1996; Sakaguchi 2000).

Bei der LEW.1AR1-*iddm* Population konnte mittels Transferversuchen gezeigt werden, dass autoaggressives Potential auf Tiere des LEW.1AR1 Hintergrundstammes übertragbar ist. Interessanterweise konnte aber auch durch Transfer regulatorischer Zellen des Hintergrundstammes auf prädiabetische LEW.1AR1-*iddm* Ratten ein Schutz übertragen werden (Wedekind *et al.* 2005).

Es wird ersichtlich, dass ein Großteil der bislang dargestellten Fakten auf der Untersuchung von Tiermodellen basieren, die induziert oder spontan einen T1DM entwickeln. Vor allem Untersuchungen über den Verlauf der prädiabetischen Phase, in der noch keinerlei klinische Symptome auftreten, wurden an spontan-diabetischen Tiermodellen vorgenommen. Diese ermöglichen in einem hochstandardisierten Kollektiv die Durchführung von Versuchen, die aus ethischen Gründen am menschlichen Organismus nicht möglich wären. Ein weiterer Vorteil der Tiermodelle ist der definierte genetische Hintergrund, der vor allem bei den Nagetiermodellen durch hinreichend lange selektive Inzucht entstanden ist.

Im Weiteren sollen verschiedene Tiermodelle des T1DM kurz vorgestellt werden. Der Schwerpunkt wird auf den spontan-diabetischen Nagetiermodellen liegen.

1.3. Tiermodelle des Diabetes mellitus Typ 1

Tiermodelle des Typ 1 Diabetes mellitus sind seit mehr als 30 Jahren in der experimentellen Diabetologie etabliert (Buschard 1996; Rabinovitch 1998). Sie erlauben eine detaillierte Untersuchung der Pathomechanismen der β -Zellzerstörung, die aus ethischen Gründen (in westlichen Ländern werden keine Pankreasbiopsien durchgeführt) sowie aus Gründen des Zeitverlaufes nicht an diabetischen Patienten durchgeführt werden können. Zudem sind in der Regel schon circa 90 % der β -Zellmasse durch die Autoimmunattacke zerstört, bevor die Patienten klinisch auffällig werden (Eisenbarth 2008).

Eine mögliche Unterteilung der Tiermodelle des T1DM erfolgt durch die Einteilung in spontan-diabetische und induzierte Diabetesmodelle. Induzierte Diabetesmodelle entstehen durch die Gabe von diabetogenen Substanzen wie Streptozotocin (STZ) oder Alloxan, welche die insulinproduzierenden β -Zellen zerstören und eine Hyperglykämie, verbunden mit anderen charakteristischen Diabetessymptomen, auslösen (Lenzen 2007; Lenzen 2008a).

Spontan-diabetische Tiermodelle haben den Vorteil, dass sie der Situation im Menschen ähnlicher sind, da auch hier die Erkrankung immun-mediiert ist. Spontan-diabetische Tiermodelle gibt es in den verschiedensten Tierarten: spontan-diabetische Hunde wie der Keeshond (Kramer *et al.* 1980), verschiedene Meerschweinchenkolonien (Munger & Lang 1973), eine Kolonie der New-Zealand White Kaninchen (Conaway *et al.* 1980) oder der Chinese Hamster (Meier & Yerganian 1959), welcher ein Tiermodell für den humanen T2DM darstellt.

In der experimentellen Diabetologie haben sich jedoch vor allem drei Nagetiermodelle durchgesetzt. Diese sind die NOD Maus (Tochino 1987), die BB Ratte (Nakhoda *et al.* 1977) und im eingeschränkten Maße die KDP Ratte (Komeda *et al.* 1998), ein Substamm der Long-Evans Tokushima Lean (LETL) Ratte. Vorteile der Nagetiere liegen in der sehr kurzen Generationenfolge und damit in der Möglichkeit, selektive Züchtungsprogramme durchzuführen, der kostengünstigen und Platz sparenden Haltungsmöglichkeit, sowie der Tatsache, dass die Zucht bei Maus und Ratte nicht jahreszeitlichen Abhängigkeiten unterliegt.

Erst am Anfang der Entwicklung als spontan-diabetisches Tiermodell stehen diverse transgene Mausmodelle, in denen β -zellspezifische T-Zellrezeptoren und Antigene den Autoimmunprozess induzieren (Christen & von Herrath 2002).

Vor 10 Jahren ist durch eine Spontanmutation ein weiteres Tiermodell des T1DM, die LEW.1AR1-*iddm* Ratte, hinzugekommen (Lenzen *et al.* 2001), die in der vorliegenden Dissertation für die genetischen und immunologischen Untersuchungen verwendet wurde.

1.3.1. Die NOD Maus

Untersuchungen der NOD Maus als Tiermodell für den Typ 1 Diabetes mellitus haben zu vielen Erkenntnissen über die Genetik des T1DM geführt.

Die NOD Maus stammt ursprünglich aus dem CTS (Cataract Shionogi) Stamm der Shionogi Research Laboratorien in Japan, der in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts aus dem Auszuchtstamm Jcl:ICR ingezüchtet wurde (Ikegami & Makino 2001). In der 20. Inzuchtgeneration wurde bei einem Tier ein spontaner Diabetes mellitus Typ 1 festgestellt.

Die Nachkommen dieses diabetischen Tieres wurden als *non-obese diabetic* Mausstamm (NOD Maus) bezeichnet und weiter selektiv auf die Diabeteserkrankung hin ingezüchtet (Ikegami & Makino 2001).

Es erkrankten dabei 70 % der weiblichen Tiere, jedoch nur 30 % der männlichen Tiere, so dass eine genetisch bedingte Geschlechtspräferenz vorliegt (Makino *et al.* 1980). NOD Mäuse entwickeln spontan ab der 4. Lebenswoche einen Diabetes mellitus mit einer ansteigenden, kumulativen Inzidenz von 60 – 90 % bis zur 30. Lebenswoche. Bei 20 Wochen alten Tieren findet sich bei bis zu 100 % der Tiere beiderlei Geschlechts eine ausgeprägte Infiltration von Immunzellen um und in die Insel hinein (Makino *et al.* 1985), wobei die Immunzellen zunächst außerhalb der Insel lokalisiert (Peri-Insulitis) sind. Diese folgende Insulitis kann später zu einem manifesten Diabetes führen (Fujita 1982). So entwickelt sich die Insulitis bei den meisten männlichen Tieren nicht zu einer β -Zellzerstörung und zum Diabetes (Kolb 1987; Tochino 1987). Mit der Progression der Insulitis in der Insel kommt es insbesondere bei den weiblichen NOD Mäusen zu einer β -Zellzerstörung, von der kumulativ 80 % der Tiere betroffen sind.

Die lymphozytären Infiltrationen sind bei der NOD Maus nicht nur auf die Pankreasinsel beschränkt, sondern finden sich auch in der Schilddrüse, den Speichel- und Tränendrüsen, sowie in seltenen Fällen in der Niere, der Muskulatur und im peripheren und zentralen Nervensystem (Makino *et al.* 1980; Ikegami & Makino 2001).

Allerdings zeigen NOD Mäuse die für die Manifestation des Diabetes erforderlichen, angeborenen Defekte des Immunsystems, die eine Verlagerung von potentiell autoreaktiven T-Lymphozyten in die Peripherie und somit auch in die Pankreasinsel fördern. Insbesondere ein Defekt der antigenpräsentierenden Zellen, wurde für eine funktionsgestörte Toleranzentwicklung verantwortlich gemacht. Zusätzlich begünstigt ein weiterer Defekt der NK und NKT Zellen die Entwicklung eines autoimmunen T1DM (Poulton *et al.* 2001). Darüber hinaus wurden auch Funktionsdefekte der T-Lymphozyten gefunden, wobei apoptotische Signalwege in diesen Zellen gestört sind (Kishimoto & Sprent 2001).

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle bei der β -Zellzerstörung, da nicht diabetische Tiere nach adoptivem Transfer von Milzzellen diabetischer Tiere ebenfalls an einem Diabetes mellitus erkranken. Zudem kann durch Thymektomie in der Neonatalperiode der Ausbruch der Krankheit verhindert werden (Ogawa 1985).

Die NOD Maus zählt zu den genetisch am besten untersuchten Tiermodellen des Diabetes mellitus (Serreze & Leiter 2001). Genetische Analysen der NOD Maus haben gezeigt, dass

die Diabeteserkrankung mit vielen, rezessiven Loci inklusive des H2 Locus, der dem menschlichen MHC entspricht, assoziiert ist. Die NOD Maus besitzt den MHC Haplotyp $H2^{g7}$ ($H2^{g7} = K^d, Ad^d, Ab^{g7}, Ea^d, Eb^{null}, D^b$) (Kikutani & Makino 1992) und wird auch als Eb^{null} -Mutante bezeichnet. Das $H2Eb^{null}$ Allel ist homolog zum humanen *HLA-DRB7* Allel (Figuroa *et al.* 1982; Klein *et al.* 1982), welches als Kandidat für die Vermittlung einer Diabetessuszeptibilität beim Menschen gilt (s. Genetik des T1DM). Aufgrund der Nullmutation in der MHC Klasse II zeigt die NOD Maus die bereits oben erwähnten Defekte wie eine veränderte Antigenpräsentation, Fehler in der Regulation des T-Lymphozytenrepertoires und eine Funktionsstörung der NK Zellpopulation (Serreze 1993). Ausserdem fehlt den Tieren die hämolytische Komplementfraktion C'5 (Baxter & Cooke 1993).

Kopplungsanalysen mittels Mikrosatellitenmarker konnten bislang 28 Diabetes-suszeptibilitätsloci identifizieren, die tabellarisch im Anhang zusammengefasst sind und als *Idd*-Loci bezeichnet werden. Die Suszeptibilitätsloci sind über das gesamte Genom der Maus verteilt und bis jetzt nur selten mit einem funktionellen Gen assoziiert. Gene, die als Kandidatengene diskutiert werden, spielen zumeist eine entscheidende Rolle für die Funktion von Immunzellen oder bei der Initiierung und Ausführung des apoptotischen Zelltodes. Dies sind z.B. der MHC Locus (*Idd1*, *Idd16*), T-Lymphozytenmarker (*Idd2*), Zytokine (*Idd3*, *Idd13*), apoptoseassoziierte Strukturen (*Idd5*) und NK-Zellmarker (*Idd6*). Wie die Bezeichnung Kandidatengene impliziert, konnten die vermuteten Gene bislang nicht in einer pathogenetischen Kausalkette der Diabetesentstehung der NOD Maus zugeordnet werden. Einige Suszeptibilitätsloci wie *Idd 9.1* bis *9.3* oder *Idd 14* und *15* sind synten, d.h., sie sind auf einem Chromosom kartiert, ihre genaue Lokalisation ist jedoch unbekannt.

1.3.2. Die BB Ratte

Alle existierenden BB Rattenkolonien haben ihren Ursprung in einer Wistar Auszucht Kolonie der BioBreeding Laboratorien in Ottawa/Kanada. Das erste diabetische Tier wurde 1974 entdeckt. Mit diesem Tier wurde die erste BB-Sublinie entwickelt, die spontan an T1DM erkrankte (Nakhooda *et al.* 1977). Die Diabetesfrequenz lag zu Anfang bei ca. 10 % und konnte bis heute durch gezielte Selektion auf über 90 % in einigen Kolonien erhöht werden (Ramanathan & Poussier 2001).

Die BB Ratten können in diabetessuszeptible (BB-DP) und diabetesresistente (BB-DR) Substämme unterteilt werden (Butler *et al.* 1990). Diese Tiere unterscheiden sich nicht nur in der Diabetessuszeptibilität, sondern auch in weiteren genetischen Merkmalen. Somit ist BB-DR nur bedingt als Kontrollstamm zu BB-DP geeignet. In einer Studie mit 11 verschiedenen BB Rattenkolonien wurden über 20 verschiedene BB Rattenstämme beschrieben (Eisenbarth 2008). Diese Substämme ließen sich in vier Gruppen einteilen, wobei die Zuordnung über Proteinmarker erfolgte (Prins 2001). Hieraus resultiert die hohe genetische Variabilität des BB Rattenmodells, welche die Identifizierung von Diabetessuszeptibilitätsloci im Vergleich zu einem syngenem System erschwert.

Die Diabetesmanifestation der BB Ratte verläuft spontan zwischen dem 60. und 100. Lebensjahr (Crisa *et al.* 1992). Die Hyperglykämie ist begleitet von Ketonurie, Hypoinsulinämie und Gewichtsverlust (Nakhoda *et al.* 1977). Die Insulinsekretion der Tiere ist bei Glukosebelastung bis etwa 10 Tage vor Diabetesmanifestation normal, dann fällt die Sekretionsantwort in dem selben Maße ab, wie die β -Zellmasse abnimmt (Teruya *et al.* 1993). Im Gegensatz zur NOD Maus gibt es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Diabetesinzidenz der BB Ratte (Nakhoda *et al.* 1977). Zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation der BB Ratte sind mononukleäre Infiltrationen innerhalb der Langerhansschen Inseln sowie im periinsulären Bereich vorhanden (Nakhoda *et al.* 1977; Crisa *et al.* 1992). Die ersten Infiltrationen (Insulitis) lassen sich zwei bis drei Wochen vor Diabetesmanifestation bei den Tieren beobachten. Danach verläuft die Zerstörung progredient und in „chronisch“ diabetischen Tieren existieren nur noch β -zellfreie „End Stage“ Inseln, die kaum oder keine Immunzellen mehr enthalten. Unter den ersten infiltrierenden Immunzellen befinden sich insbesondere Makrophagen (Hanenberg *et al.* 1989). Die β -Zellen werden dann von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten, NK Zellen und zum Schluss, in einem geringeren Ausmaß, von B-Zellen infiltriert. Daraus resultiert schließlich das Vollbild des T1DM (Mordes *et al.* 2001). Die Tiere zeigen zusätzlich zu den Infiltrationen des Pankreas auch Infiltrationen in der Schilddrüse, die jedoch nicht zu einer Thyreoditis führen (Mooij *et al.* 1993; Reimers *et al.* 1996; Mori *et al.* 1998).

Trotz der verschiedenen Substämme exprimieren alle spontan diabetischen BB Ratten den MHC *RT1^u* Haplotyp, entwickeln eine Insulitis mit selektiver β -Zellzerstörung und besitzen das Merkmal einer ausgeprägten, angeborenen Lymphopenie (Mordes *et al.* 2001). Ursächlich für das fast völlige Fehlen der $RT6^+$ T Zellen im peripheren Blut ist das *Lyp* Gen, das als Mutation im *Ian5/Ian411* Locus (*Ian* = *Immune associated Nucleotide*) identifiziert wurde (Mojcik *et al.* 1988; Hosszufalusi *et al.* 1993; Hornum *et al.* 2002; MacMurray *et al.* 2002).

Dagegen ist die Expression von RT6⁺ auf intestinalen intraepithelialen Lymphocyten (IEL) nicht beeinflusst (Fangmann *et al.* 1991). Heute wird RT6⁺ auch als Art2 (*ADP-ribosyltransferase 2*) bezeichnet. Die wichtige protektive Funktion dieser T-Zellsubpopulation wird deutlich, da nach Depletion mit einem RT6.1 Antikörper auch BB-DR Ratten einen Diabetes entwickeln (Jiang *et al.* 1990).

Die beschriebene Lymphopenie in peripheren T-Zellen, sowie eine Fehlfunktion bei den verbleibenden Zellen (Bellgrau *et al.* 1982), ist obligat für die Diabetesmanifestation der BB Ratte und stellt einen wesentlichen Unterschied zum humanen T1DM dar (Klötting *et al.* 1997).

Der adoptive Transfer von aktivierten Lymphocyten diabetischer Tiere in athymische Nacktratten und nicht-diabetische BB Ratten induziert eine Insulitis mit einer anschließenden Zerstörung der β -Zellen (Crisa *et al.* 1992).

Bei der Diabeteserkrankung der BB Ratte handelt es sich im Gegensatz zur NOD Maus um einen oligogenen Vererbungsmodus. Bislang konnten 10 Suszeptibilitätsloci identifiziert werden, die tabellarisch im Anhang aufgeführt sind. Die im Gegensatz zur NOD Maus geringere Anzahl an Suszeptibilitätsloci der BB Ratte kann von der geringeren Heterogenität des genetischen Hintergrundes herrühren. Gleichzeitig erschwert der extrem starke Einfluss des *Lyp* Locus die Analyse weiterer diabetesrelevanter Gene der BB Ratte.

Der *Lyp* Locus wurde auf Chromosom 4 (RNO4) der BB Ratte lokalisiert und zunächst als *Iddm1* benannt (Jacob *et al.* 1992). Nach der Entscheidung des RGNC (Rat Genome and Nomenclature Committee) soll nun der *Lyp* Locus als *Iddm2*, der MHC bzw. *RT1* Locus in Übereinstimmung mit Mensch (*IDDM1*) und Maus (*Idd1*) als *Iddm1* bezeichnet werden. Diese Änderung wird auch in dieser Arbeit übernommen (Hornum *et al.* 2004). Der *Lyp* Locus ist verantwortlich für den schwerwiegenden Verlust an peripheren T-Lymphocyten, der in homozygoten Tieren vorliegt (Elder & Maclaren 1983).

Das Gen, das diese Lymphopenie verursacht, wurde unlängst als eine *Frameshift* Deletion im *Ian5* (*Ian411*) Gen identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein GTP-bindendes Protein, das die Differenzierung von RT6⁺ Immunzellen maßgeblich beeinflusst. Die Mutation führt zu einem Abbruch des Proteinstranges während der Synthese, was in einem defekten Genprodukt und der Lymphopenie resultiert (Hornum *et al.* 2002; MacMurray *et al.* 2002). Nähere Untersuchungen ergaben nun, dass es sich bei dem Genprodukt um ein Membranprotein der äußeren Mitochondrienmembran handelt, das GTP-Bindungsaktivität besitzt. Die Abwesenheit von *Ian411* führt zu mitochondrialer Dysfunktion, einem erhöhten Spiegel an

stressinduzierten Chaperonen und einer T-zellspezifischen, spontanen Apoptose (Pandarpurkar *et al.* 2003).

Wie bei der NOD Maus, dem T1DM des Menschen und vielen anderen Autoimmunerkrankungen, ist der MHC mit der Diabetespathogenese der BB Ratte assoziiert. Hier scheint der RT1-B^u/D^u MHC Klasse II Haplotyp suszeptibilitätsvermittelnd für den Diabetes zu sein. Dieser MHC Suszeptibilitätslocus wurde zunächst *Iddm2* genannt und wird nun als *Iddm1* bezeichnet (Colle *et al.* 1981; Ellerman & Like 2000). In Kreuzungsversuchen konnte festgestellt werden, dass die beiden Loci *Iddm1* und *Iddm2* nicht ausreichen, um in BB Ratten einen Diabetes mellitus auszulösen. Deshalb wurden in diesem Tiermodell weitere Suszeptibilitätsloci vermutet und durch genetische Analysen identifiziert (s. Anhang). Die Nomenklatur der einzelnen Suszeptibilitätsregionen der Ratte ist jedoch relativ uneinheitlich und einige Bezeichnungen sind doppelt vergeben. Die Arbeitsgruppe um Klötting (Klötting *et al.* 1995; Klötting *et al.* 1998a) beschrieb den *Iddm3* Locus auf RNO18 in der Nähe des *Olf* Gens, das für das olfaktorische, neuronspezifische G-Protein kodiert. Bis heute ist das suszeptibilitätsvermittelnde Gen des *Iddm3* Locus nicht identifiziert worden. Ebenfalls als *Iddm3* Locus wurde ein Bereich auf RNO2 bezeichnet. Dieser resistenzvermittelnde Locus hat Einfluss auf den Metabolismus und die Körpergewichtsregulation der BB Ratte (Klaff *et al.* 1999).

Ein resistenzvermittelnder Locus wurde als *Iddm5r* bezeichnet (Klötting *et al.* 1998b). Dieser kartiert auf RNO1 im Bereich der Gene *Igf2* und *Tnt*. Das eigentliche Gen, das Einfluss auf die Diabetessuszeptibilität hat, konnte bislang noch nicht identifiziert werden.

1.3.3. Die KDP Ratte

Im Jahr 1983 wurden im Tokushima Research Institute in Japan spontan-diabetische Ratten in einem Long-Evans Auszuchtstamm entdeckt, der ein Jahr zuvor von Charles River, Kanada erworben worden war (Kawano *et al.* 1991). Dieser Stamm ist allerdings auch heute noch nur in Japan zugänglich.

Diabetische Nachkommen von Tieren dieser Kolonie wurden ingezüchtet und als LETL Stamm bezeichnet. Es wurde hierbei eine Diabetesinzidenz von etwa 30 % erreicht (Kawano *et al.* 1991). Der gleichzeitig als Kontrollstamm angelegte LETO Stamm zeigte innerhalb von 20 Generationen keine Diabeteserkrankung (Kawano *et al.* 1991). Die Eignung des LETO Stammes als Kontrollstamm ist jedoch aufgrund der genetischen Heterogenität der beiden Stämme fraglich. Die Diabetesfrequenz der LETL Ratte wurde durch selektive Inzucht erhöht (Komeda *et al.* 1998). Der hieraus entstandene neue Stamm wurde als Komeda Diabetes-

Prone (KDP) bezeichnet (Yokoi *et al.* 1997; Komeda *et al.* 1998). Da die Tiere nur am Tokushima Research Institute gezüchtet wurden, entstanden keine Substämme, wie sie für die BB Ratte charakteristisch sind.

Der Diabetes der KDP Ratte manifestiert sich spontan in einem Alter zwischen 100 und 120 Tagen. Die kumulative Häufigkeit für den T1DM liegt bei 70 % in einem Alter von 120 Tagen und steigt in einem Alter von 220 Tagen auf 82 % (Yokoi *et al.* 1997). Obwohl nicht alle KDP Ratten an einem T1DM erkranken, entwickeln alle Tiere eine moderate bis schwere Insulinitis. Bezüglich der Inzidenz wurden keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern gefunden (Kawano *et al.* 1991). Auch bei der KDP Ratte führen lymphozytäre Infiltrationen in den Inseln des Pankreas zur Zerstörung der β -Zellen und zur Diabetesmanifestation. Extrapankreatische lymphozytäre Infiltrationen zeigen sich in Speichel- und Tränendrüsen (Kawano *et al.* 1991). Die einzelnen Immunzellsubpopulationen wurden jedoch nicht identifiziert und quantifiziert und bis heute gibt es auch noch keine näheren Untersuchungen auf immunologischer Ebene.

Eine Suszeptibilitätsregion fand sich, wie beim Menschen und den anderen T1DM Nagetiermodellen, im Bereich des MHCs. Auch die KDP Ratte besitzt den MHC Haplotyp RT1B^u/D^u (Kawano *et al.* 1991).

Außerdem konnte auf RNO11 in der Nähe des *Mox2* Gens eine Suszeptibilitätsregion lokalisiert werden, die als *Iddm/kdp1* benannt wurde. Durch Feinkartierung der Region auf RNO11 und Sequenzierung eines Ratten YAC Contigs konnten zwei Gene, *Alcam* und *Cblb* kartiert werden. Beide Gene wurden zunächst als Kandidatengene diskutiert. *Alcam* fungiert als Kandidatengen, da er ein CD6 Ligand ist und eine mögliche Rolle im Thymozyten-Thymusepithel Zelladhäsionsgeschehen spielt. *Cblb*, ist ein Mitglied einer Familie von Ubiquitin-Protein-Ligasen, ist aufgrund seines Einflusses auf die T-Zellaktivierung interessant. Dieser Einfluss konnte schon bei der Untersuchung eines *Cblb*-defizienten Mausmodells gezeigt werden (Bachmaier *et al.* 2000; Chiang *et al.* 2000). Weitere Untersuchungen der KDP Ratte ergaben schließlich eine Mutation im *Cblb* Gen (Yokoi *et al.* 1997; Yokoi *et al.* 2002). Diese Mutation gilt als Auslöser des T1DM der KDP Ratte.

1.3.4. Die LEW.1AR1/Ztm-*iddm* Ratte

Der Stamm LEW.1AR1/Ztm-*iddm*, kurz IDDM Ratte genannt, entstand 1997 durch eine Spontanmutation im MHC congenen Inzuchtstamm LEW.1AR1, die zu einer diabetischen Stoffwechsellage führte. Diese Mutation konnte vom Hintergrundstamm isoliert und als separater Inzuchtstamm LEW.1AR1/Ztm-*iddm* weitergeführt werden. Die Tiere erkranken spontan in einem Alter von ca. 60 Tagen und manifestieren die klassischen Symptome eines Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) und zeigen das klassische Bild eines Autoimmundiabetes mit einer progradienten Hyperglykämie, einer Ketoazidose und einem Gewichtsverlust, der ohne Insulinsubstitution innerhalb von 10 Tagen letal endet. Die Pankreasinseln diabetischer Tiere zeichnen sich durch eine Insulitis aus (Lenzen *et al.* 2001). Eine Verlaufsstudie zeigte, dass vor dem 45. Lebenstag keine morphologischen Veränderungen des Pankreas bei den LEW.1AR1-*iddm* Ratten festzustellen sind. Die prädiabetische Phase umfasst also maximal 10 Tage in diesem Tiermodell. Erst ab Tag 50 können in noch normoglykämischen Tieren infiltrierte Inseln im Pankreas der prädiabetischen Phase ermittelt werden. Der Hauptzelltyp zu diesem frühen Infiltrationszeitpunkt sind Makrophagen, wobei aber auch hier schon CD4⁺ und CD8⁺-T-Lymphozyten im Inselinfiltrat vorhanden sind. Ein Stadium der Peri-Insulitis ohne Infiltration in das Inselorgan ist bei diesem Tiermodell nicht gegeben. Mit zunehmender Infiltration des Inselorgans kommt es zu deutlichen absoluten und relativen Verschiebungen der einzelnen Immunzellsubpopulationen. Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen verdoppelt sich, während der Anteil an CD8⁺ T-Zellen bis um das fünffache ansteigen kann, so dass dieser Zelltyp im späten Stadium der Infiltration dominiert. (Jörns *et al.* 2005)

Im Gegensatz zu den anderen Tiermodellen ist keine Infiltration eines anderen Organs wie der Schilddrüse, verschiedener Speicheldrüsen und anderer endokriner Organe festzustellen (Jörns *et al.* 2004). Nur im chronischen Verlauf kam es in der Niere zu den klassischen Zeichen einer diabetischen Nephropathie (Jörns *et al.* 2004).

Die Diabetesinzidenz in der Zuchtkolonie beträgt 60 %, wenn zwei diabetische LEW.1AR1-*iddm* Tiere unter SPF (*specific pathogene free*)-Bedingungen verpaart werden. Diabetische Tiere werden für die Zucht durch subkutane Implantation eines Insulinpellets therapiert.

Bei der LEW.1AR1-*iddm* Ratte konnte die zum T1DM führende Mutation bislang noch nicht ermittelt werden. Ein Hinweis auf die Anzahl der prädisponierenden Gene im LEW.1AR1-*iddm* Modell ist die 6,5 %ige Diabetesinzidenz in einer [(LEW.1AR1-*iddm* x BN) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 Rückkreuzungspopulation. Unter Berücksichtigung einer 60 %igen Penetranz kann in der Stammkombination von drei bis vier prädisponierenden Genen

ausgegangen werden. Die Kopplungsanalysen der Rückkreuzungspopulation unterstützen diese Hypothese. In der [(LEW.1AR1-*iddm* x BN) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 wurden insgesamt drei Suszeptibilitätsloci ermittelt, die im zentromeren (*Iddm9*) und telomeren Bereich (*Iddm8*) auf Chromosom 1 (RNO1) und auf Chromosom 20 (RNO20) im Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, *Iddm1*) kartieren (Lenzen *et al.* 2001; Weiss *et al.* 2005). Die chromosomalen Bereiche der LEW.1AR1-*iddm* Ratte, in denen *Iddm8* und *Iddm9* kartieren, sind homolog zu chromosomalen Bereichen des Menschen auf Chromosom 6, 10 und 11 in denen ebenfalls Suszeptibilitätsloci für T1DM kartieren. Die *Iddm8* Region der Ratte entspricht einem Bereich, in dem *IDDM4* und *IDDM17* kartieren und in der homologen Region zu *Iddm9* lokalisieren beim Menschen *IDDM5* und *IDDM8*. Interessanterweise wurden weder *Iddm8* noch *Iddm9* mit Hilfe der BB Ratte identifiziert.

1.4. Fragestellung

Die Zucht der LEW.1AR1-*iddm* Ratte, eines neuen Tiermodells des menschlichen Typ 1 Diabete mellitus (T1DM), konnte 1997 nach einer Spontanmutation als koisogener Stamm zu dem intra-MHC-rekombinanten-Inzuchtstamm LEW.1AR1 ($RT1^{r2}$: $RT1-A^a$, $RT1-B/D^u$, $RT1-C^u$) erfolgreich etabliert werden. Das veränderte immunologische Milieu in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte führt bei 60 % der Tiere zur Entwicklung eines T1DM um den 60. Lebensstag. Zur weiteren Aufklärung der Pathomechanismen, die zur Diabetesmanifestation in diesem Tiermodell führen, wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Im Bereich der Genetik sollten die bereits identifizierten Genloci auf verschiedenen Chromosomen auf ihre Relevanz bei der Diabetesentstehung überprüft werden. Mit Hilfe einer zweiten Rückkreuzung [(PARxLEW.1AR1-*iddm*)xLEW.1AR1-*iddm*] sollte vergleichend zur ersten Rückkreuzung [(BNxLEW.1AR1-*iddm*)xLEW.1AR1-*iddm*] analysiert werden, ob die drei bereits identifizierten Suszeptibilitätsbereiche in Bezug auf die Diabetesmanifestation bestätigt werden können.
- Die LEW.1AR1-*iddm* Ratte zeigt nicht nur den Phänotyp des T1DM, sondern auch den Phänotyp eines heterogenen T-Zellanteils in PBLs (peripheral blood lymphocytes). Anhand der beiden bereits etablierten Rückkreuzungspopulationen sollten Suszeptibilitätsbereiche für den zusätzlichen Phänotyp ermittelt werden.
- Im Bereich der Immunologie konnte das klassische Paradigma einer Autoimmunerkrankung mit der ursächlichen Beteiligung von Immunzellen für die Ätiologie des T1DM durch den adoptiven Transfer von Lymphozyten für das LEW.1AR1-*iddm* Modell bestätigt werden. Mit Hilfe selektiver Transferversuche sollte das autoaggressive bzw. das regulatorische Potential verschiedener T-Zellsubpopulationen untersucht werden.

Es war daher das Ziel dieser Arbeit, folgende Fragen zu beantworten:

- Können bereits identifizierte Suszeptibilitätsbereiche für die Diabetesmanifestation in der weiteren Rückkreuzungspopulation bestätigt werden?
- Welche Genloci sind verantwortlich für die Varianz im T-Zellanteil bei den LEW.1AR1-*iddm* Ratten im Vergleich zum Hintergrundstamm?
- Sind diese ermittelten Suszeptibilitätsbereiche identisch mit denen für den Phänotyp des T1DM?

-
- Welche Zellpopulationen vermitteln autoaggressives Potential? Welche Zellpopulation hat eine regulatorische Funktion?
 - Ist das regulatorische Potential in diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Tieren nicht vorhanden?
 - Welcher Mechanismus liegt der regulatorischen Wirkungsweise zugrunde?

2. Publikationen

Titel:

The mutation of the LEW.1AR1-*iddm* rat maps to the telomeric end of RNO1

Zeitschrift:

Mammalian Genome

Publiziert am 19.04.2008.

Aufgrund urheberrechtlicher Gründe kann die PDF Version des Manuskriptes hier nicht gedruckt werden. Falls sie diese dennoch ansehen möchten, folgen sie bitte diesem Link:

<http://www.springerlink.com/content/p34683885361g253/?p=6a428e6420ab4169b473b236dc2d401d&pi=0>

Titel:

The mutation of the LEW.1AR1-*iddm* rat causes not only to Type 1 diabetes mellitus development but also to a heterogenous T-cell content

In Vorbereitung.

Titel:

Prevention of type 1 diabetes development in the LEW.1AR1-*iddm* rat is mediated by selective CD8⁺ T-cell transfer inducing a cytokine shift in the pancreas draining lymph nodes

Zeitschrift:

Diabetes

Zur Publikation eingereicht.

The mutation of the *LEW.1AR1-iddm* rat maps to the telomeric end of rat chromosome 1

Short title: Genetics of T1DM

Heike Weiss^{1,3} · Tanja Arndt^{1,2} · Anne Jörns¹ · Sigurd Lenzen¹ · Edwin Cuppen⁴ · Hans J Hedrich² · Markus Tiedge³ · Dirk Wedekind²

* H. Weiss and T. Arndt contributed equally to this study.

¹Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany

²Institute of Laboratory Animal Science, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany

³Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Rostock, 18057 Rostock, Germany,

⁴Hubrecht Institute, 3584 Utrecht, The Netherlands

Correspondence: **Heike Weiss, Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Rostock, Schillingallee 70, 18057 Rostock, Germany**

fon: 0049-381-4945750

fax: 0049-381-4945752

e-mail: heike.weiss@med.uni-rostock.de

Abstract

The LEW.1AR1-*iddm* rat is an animal model of human type 1 diabetes mellitus (T1DM) with an autosomal recessive mode of inheritance. T1DM susceptibility loci could be localised on chromosome (RNO) 20 in the MHC region (*Iddm1*) and on RNO1 (*Iddm8*, *Iddm9*) in a BN backcross cohort. In this study the impact of the different susceptibility regions on diabetes development was investigated in a backcross population of the diabetes-resistant PAR strain.

A cohort of 130 [(PARxLEW.1AR1-*iddm*)xLEW.1AR1-*iddm*] N2 rats was monitored for blood glucose and analysed by linkage analysis.

16% of the PAR backcross animals developed T1DM. Genetic analysis revealed significant linkage to T1DM in the MHC region on RNO20p12. In contrast to the linkage analysis of the BN backcross cohort only one susceptibility locus for T1DM could be identified on RNO1. This susceptibility region on RNO1 mapped at the telomeric end corresponding to *Iddm8*. 89% of diabetic PAR backcross animals were homozygous for *Iddm8*. The *Iddm9* diabetes susceptibility region showed no linkage to diabetes in the PAR backcross cohort.

The data of this study provide evidence that the mutation leading to T1DM in the LEW.1AR1-*iddm* rat is located at the telomeric end of RNO1 corresponding to *Iddm8*.

Introduction

Insulin-dependent diabetes mellitus Type 1 (T1DM) is a multifactorial disease in which a predisposing genetic background as well as environmental factors ultimately lead to an autoimmune destruction of the pancreatic beta cells (Bach 1994). Animal models play an important role for the elucidation of the pathogenesis of T1DM because they allow to combine genetic and functional characterisation of the syndrome (Lally & Bone 2003). The LEW.1AR1-*iddm* rat is a model for T1DM which arose through a spontaneous mutation in the intra-MHC recombinant inbred strain LEW.1AR1 (RTI^{r2} , $RTI-A^a$, $RTI-B/D^u$, $RTI-C^u$) (Lenzen et al. 2001). The diabetic syndrome of the LEW.1AR1-*iddm* rat followed an autosomal recessive mode of inheritance with an incomplete penetrance of the mutant phenotype of about 60 %. Recently, three T1DM susceptibility loci in the LEW.1AR1-*iddm* model have been discovered by linkage analysis using a (BN x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm* N2 (BN N2) (Weiss et al. 2005). One of them mapped to RNO20p12 within the Major Histocompatibility Complex (MHC) region. The MHC is described as a chromosomal region providing T1DM susceptibility in humans (*IDDM1*) and animal models in particular the NOD mouse (*Idd1*), the Biobreeding (BB) rat and the Komeda Diabetes Prone (KDP) rat (*Iddm1*) (Lally & Bone 2003). Thereby, the MHC haplotype plays a pivotal role in permitting T1DM development (Günther et al. 1991; Ellerman & Like 2000). The unique $H2^{g7}$ haplotype of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse (Kikutani & Makino 1992) and the RTI^u haplotype (Ellerman & Like 2000) of the rat are prerequisites for spontaneous T1DM development even though not the sole cause.

In the LEW.1AR1-*iddm* rat two additional *Iddm* loci reside on RNO1 and have not been described before in rat T1DM models. The *Iddm8* locus has been discovered within RNO1q51 – 55 at the telomeric end and *Iddm9* could be localised in RNO1p11 – 1q11 near the centromer using a [(BN x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 backcross population. Interestingly, RNO1q51 – 55 is homologous to HSA10q25 containing *IDDM17* and

RNO1p11 – 1q11 is homologous to HSA6q25-27 containing *IDDM5* and *IDDM8* (Luo et al. 1995). Although there are some interesting candidate genes for *Iddm8* and *Iddm9* the diabetes causing mutation of the LEW.1AR1-*iddm* rat remains unknown.

In this study a [(PAR x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 (PAR N2) cohort was characterized by genetic analysis to identify the mutated locus and to elucidate the impact of the genetic background different to that of the BN rat on T1DM development. Our data provide evidence that a mutation within the *Iddm8* locus on RNO1 confers susceptibility to T1DM.

Material and Methods

Experimental animals: Inbred PAR/Ztm rats ($RT1^s$: $RT1-A^s$, $RT1-B/D^l$, $RT1-C^l$) were used for the generation of a N2 backcross population with LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rats (Information about the model and contact address for requests of animals are given at <http://www.mh-hannover.de/3642.html>). The PAR/Ztm strain was chosen for this study due to its genetic diversity to LEW (Canzian 1997). The PAR strain is one of the oldest rat strains of the world. The origin of this strain is the *Jardin de Plantes*, a museum of natural history in Paris, where this strain was established as a source of food for reptiles. In 1988 Dr. H. Bazin subsequently inbred the rats at the Faculty of Medicine, Experimental Immunology Unit, University of Louvain (Wsl) (Hedrich 2006; Lindsey & Baker 2006). The PAR/Wsl strain was transferred to the Institute of Laboratory Animal Science, Hannover Medical School (Ztm). PAR/Ztm rats were in generation F_x+10 when used for this study. Notably, none of the PAR/Ztm rats spontaneously developed diabetes or other diseases. A F1 generation was produced by mating diabetic male LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rats with female PAR/Ztm rats. Then the non-diabetic (PAR x LEW.1AR1-*iddm*) F1 female offspring was backcrossed to diabetic male LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rats. 130 [(PAR x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 (referred as PAR N2) animals were continuously monitored for blood glucose concentrations and submitted to a genome-wide microsatellite analysis. All rats were regularly monitored and determined to be free from infections by typical pathogens according to the FELASA recommendations (Nicklas et al. 2002). The rats were held in groups of three animals under a 12:12 light-dark cycle, 55 ± 5 % relative humidity, in type IIR Macrolon^R cages (810 cm²), with free access to sterilised standard laboratory rat chow (diet No. 1324, Altromin, Lippe, Germany) and water. All rats were checked for blood glucose changes twice a week until day 120 of life. Blood glucose was measured by the glucose oxidase method (Glucometer Elite, Bayer, Leverkusen, Germany) in blood collected from the tail vein. Diabetic animals were

killed within 48 h after onset of hyperglycaemia for preparation of genomic DNA from tail, ear biopsies and tissue samples (spleen, thymus). The same procedure was applied to non-diabetic N2 animals after the age of 120 days. To exclude false positive data with respect to autoimmune infiltration of islets, the cut-off for T1DM diagnosis was set at 10 mmol/l. All pancreases of the diabetic animals and of the non-diabetic animals of the backcross population were analysed morphologically for immune cell infiltration. The data were compared with those of the [(BN x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 (referred as BN N2) backcross population as described previously (Weiss et al. 2005).

DNA samples: Genomic DNA was extracted from the tissues using the NucleoSpin™ Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Microsatellite analyses: All oligonucleotide primers used in this study were developed and used as described previously (Weiss et al. 2005). The complete list of all used microsatellites markers and the primer sequences is presented as supplementary information.

PCR reactions and electrophoresis of DNA fragments were performed and analysed as described (Weiss et al. 2005).

Statistical analyses: Linkage analysis was performed using the JoinMap V 2.0 program (Agricultural Research Department, Wageningen, Netherlands). The LOD scores of the diabetes susceptibility regions were calculated using the R/qtl program (Broman et al. 2003). E/M algorithms estimated susceptibility regions in a binary model using the T1DM (blood glucose > 10 mmol/l) of the animals as a trait.

A permutation test was performed based on our current genotypic and phenotypic data to calculate an individual threshold value for significance independent from the theoretical model of Lander and Kruglyak (Lander & Kruglyak 1995).

Results

A total cohort of 130 [(PAR x LEW.1AR1-*iddm*) F1 x LEW.1AR1-*iddm*] N2 animals was generated (gender: ♀ 85, ♂ 45). No animal of the F1 generation developed diabetes (data not shown). Nineteen (~ 16 %) of the N2 backcross animals (gender: ♀ 12, ♂ 7) developed diabetes at the age of 58 ± 2 days, whereas none of the animals developed diabetes after the age of 120 days. Blood glucose concentrations at the time of diabetes onset were 18.7 ± 1.0 mmol/l (n = 21; 95 % confidence interval 11.1 – 15.6 mmol/l). All diabetic animals showed an infiltration of pancreatic islets with immune cells resulting in a rapid destruction of the beta-cells (Fig. 1). By morphological analysis the insulinitis pattern in diabetic PAR N2 animals could not be distinguished from islet destruction in diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats and diabetic BN N2 rats (data not shown). Also the progression of hyperglycaemia was comparable between the PAR N2 backcross and LEW.1AR1-*iddm* strain leading to a severe diabetic syndrome (data not shown). None of the normoglycaemic PAR N2 animals showed an autoimmune infiltration of the pancreas. No sex difference of diabetes incidence could be observed within the PAR N2 animals as this has been described for the LEW.1AR1-*iddm* population (Lenzen et al. 2001) and a BN N2 cohort (data not shown).

Approximately 250 microsatellite markers from several genome databases (RGD, Ratmap, Whitehead, ARB database) as well as microsatellite markers developed at the Institute of Laboratory Animal Science (Ztm) were screened for polymorphisms between the LEW.1AR1-*iddm* and the diabetes resistant PAR strain. 61 informative markers were identified and subsequently used for linkage analysis with an average distance of 25 cM between the markers. Two diabetes susceptibility loci on RNO 1 and RNO 20 became evident upon linkage mapping (Fig. 2).

For *D20Rat32* (LOD 3.2, 17 cM) on RNO20p12 a significant linkage to T1DM (LOD score > 1.6) could be verified within the MHC region. Three out of nineteen diabetic animals of the

PAR N2 strain were carrying the heterozygous haplotype *RT1^{r2/g}*. The MHC haplotype of the other 16 diabetic animals was *RT1^{r2/r2}*.

A second locus for T1DM could be identified on RNO1. The diabetic syndrome in the PAR N2 corresponds significantly to *DIZtm18* on RNO1 (LOD ~ 4.0, 121.0 cM).

Fine mapping of this region with additional 17 informative microsatellite markers resulted in the peak markers *DIZtm17* (LOD 3.9, 120.9 cM) and *DIZtm19* (LOD 3.9, 121.0 cM) surrounding *DIZtm18*. (Fig.2)

The physical position of the susceptibility region on RNO1 was determined using the known sequence of the BN/SsNHsdMcw rat (UCSC). All microsatellite markers mapped in the same order of appearance as in the genetic map excluding *DIZtm18*, *DIZtm19* and *DIZtm17*. These markers are localised in RNO1q43 between 213.13 Mb and 213.19Mb downstream from *DIMgh11* at 209.1 Mb, and *DIWox22* at 203.1 Mb, while the estimated genetic order upon linkage analysis is *DIZtm17* (120.9 cM), *DIZtm19* (122.5 cM) *DIMgh11* (122.5 cM), *DIZtm18* (122.5 cM) and, *DIWox22* (124.7 cM).

The PAR N2 backcross diabetes susceptibility region is in immediate vicinity to *Iddm8* at the telomeric end of RNO1 as compared with the BN N2 data (Weiss et al. 2005). Surprisingly, no linkage was found to the *Iddm9* locus within the centromeric region of RNO1 although this part of the genome could be mapped by three informative markers (Fig. 2). Genetic analysis of diabetic PAR N2 backcross rats revealed homozygosity for the *Iddm8* region in 17 out of 19 animals (Table 1). Diabetic BN N2 backcross rats were completely homozygous for *Iddm8* (Table 1). On the other hand 3 out of 19 animals of diabetic PAR N2 backcross rats and 3 out of 14 animals of diabetic BN N2 backcross rats were heterozygous for the *Iddm1* locus (Table 1). Further analysis of *Iddm8* showed a clearly bordered susceptibility region in PAR N2 backcross whereas the telomeric peak in BN N2 backcross animals is bordered without a clearly defined margin (Weiss et al. 2005).

The diabetes susceptibility region on RNO1 was compared to the genome of human and mouse by algorithms of genome databases. The RNO1q41 – 1q43 region shows a high homology to HSA11q12.2 – 13.1 and a region on MMU19B at about 49 cM.

Discussion

In the LEW.1AR1-*iddm* model susceptibility to T1DM follows an autosomal recessive mode of inheritance with incomplete 3/5 penetrance. This raised the question whether it would be possible to link the disease causing mutation to a specific susceptibility region. From a genome-wide scan of a BN N2 backcross population it became clear that three loci, one on RNO20 and two on RNO1, were associated with the disease (Weiss et al. 2005). To refine the susceptibility loci for identification of mutated candidate genes we now investigated a PAR N2 backcross population in comparison to the BN N2 backcross. The PAR strain is an inbred rat strain, which is genetically divergent from the LEW strain, and may be therefore ideal to complement microsatellite data from the BN N2 backcross (Canzian 1997). After generation of a PAR N2 cohort 16 % of the animals developed autoimmune diabetes with the same dynamics of beta cell destruction as observed in LEW.1AR1-*iddm* rats (Fig. 1). Based on the assumption of an incomplete penetrance a diabetes incidence of 16 % theoretically indicates that one or two genes are involved in the pathogenesis of diabetes in the PAR N2 animals (Weiss et al. 2005). This corresponds well to the result of the microsatellite analysis with diabetes susceptibility loci on RNO20 within the MHC region (*Iddm1*) and on RNO1 in the telomeric region (*Iddm8*) (Fig. 2).

The *Iddm9* region nearby the centromer of RNO1 could be identified in the BN N2 backcross but not in the PAR N2 backcross cohort. It cannot be excluded that a susceptibility locus in the centromeric region of RNO1 may be present in the PAR strain. However, this finding strongly argues against *Iddm9* as the disease causing mutation within the centromeric region of RNO1.

An analysis of *Iddm8* in the diabetic BN N2 backcross cohort showed that all diabetic animals were homozygous for the peak markers *DIZtm17* and *DIZtm19*. Also in the diabetic PAR N2 backcross cohort 90 % of animals were homozygous for *Iddm8* with the peak markers

DIZtm17, *DIZtm18* and *DIZtm19*. In comparison to *Iddm1* (MHC), which revealed 15 – 20 % heterozygosity in both backcross cohorts, it can be excluded that the mutation responsible for the autosomal recessive mode of inheritance is located within the *Iddm1* locus. A heterozygous MHC haplotype within the PAR N2 population did not influence the manifestation of the disease or the insulinitis pattern as this has previously been shown for the BN N2 (Weiss et al. 2005). Diabetic rats expressing a heterozygous MHC haplotype have been described for F2 hybrids bred from diabetic BB-DP rats and congenic rats carrying different major histocompatibility (RT1) haplotypes on the LEW background (Günther et al. 1991).

The *Iddm8* locus in the BN N2 cohort mapped to RNO1q51-55 starting at *D1Rat496* (243.2 Mb) (Weiss et al. 2005). Both 1q43 and 1q51 adjoin at the telomeric end of RNO1. Interestingly, there is a notable difference in the curve progression of the telomeric susceptibility region between the BN and PAR N2 backcross cohorts. The T1DM susceptibility region identified in the PAR N2 is clearly bordered (Fig. 2), while *Iddm8* of the BN N2 has no defined end towards the telomere (Weiss et al. 2005).

Based on the results we conclude that the susceptibility region on RNO1 of the PAR N2 is identical to *Iddm8* as defined by the BN N2. The shift of the peak (162.1 cM in BN N2 vs 120.9 cM in PAR N2) can be attributed to different recombination frequencies between two loci when different strains are used for linkage analyses (<http://rgd.mcw.edu/genomescanner>). Moreover, informative markers of the BN N2 are not necessarily informative for the PAR N2. Only two RNO1 markers, *DIZtm3* and *DIMgh12*, were informative in both strains but mapped at different positions (*DIZtm3* 172 cM (BN N2) and 179 cM (PAR N2); *DIMgh12* 163.6 cM (BN N2) and 174 cM (PAR N2)). Both, diversities in recombination frequencies of analogous markers and different physical positions of disparate markers can lead to the shift of the susceptibility region on the genetic map as well as on the physical map of RNO1.

Analysis of the genomic region of the *Iddm8* peak markers of the PAR N2 backcross strain by the Ensembl database (www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/) mapped to RNO1q43 between 213.13Mb and 213.19Mb (Fig. 4). This region codes for the potential candidate genes *Cd5* (Gimferrer et al. 2003), *Cd6* (Castro et al. 2003),

Slc15a3 (Sakata et al. 2001), *Hspa5bp1* (Chang et al. 2003; Oh-hashii et al. 2003) and *Ddb1* (Sun et al. 2002), *Cd5* and *Cd6* play a significant role in T lymphocyte signal transduction and may affect autoimmunity. Complete sequence analysis of the cDNA of *Cd5* and *Cd6* from peripheral blood lymphocytes (PBL) of diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats revealed no differences to the diabetes-resistant LEW.1AR1 strain indicating that the disease causing mutation is not located within the coding region (Weiss et al., unpublished observation). However, it cannot be excluded that mutations within the promoter region affect the expression level of *Cd5* and *Cd6*. *Slc15a3* codes for a protein, which plays a role in protein catabolism in the lymphatic system thereby affecting the selection of autoaggressive T-cells. *Hspa5bp1* (heat shock 70 kDa protein 5 binding protein 1) codes for an ER/Golgi protein that negatively regulates serum starvation-induced cell death in tissue culture. *Ddb1* (damage-specific DNA binding protein 1) is involved in nucleotide excision DNA repair mechanisms. Interestingly, all genes affect either the cellular immune system or defence mechanisms of cells. Thus, the data provide a valuable basis for a more comprehensive analysis of gene and protein expression of these candidate genes in immune cells and beta cells of the LEW.1AR1-*iddm* rat during the time course of diabetes development.

Our diabetes susceptibility markers identified by PAR N2 and BN N2 backcross cohorts will help to delineate the region on RNO1, which most likely contains the mutation conferring the autosomal recessive mode of inheritance. The microsatellite data of the PAR N2 backcross animals clearly favour *Iddm8* within the telomeric region of RNO1 as the candidate locus for mutations causing autoimmune diabetes in the LEW.1AR1-*iddm* rat. The identification of the

respective gene will allow better understanding of the process leading to autoimmune destruction of beta cells in humans since the LEW.1AR1-*iddm* model shares many similarities with human T1DM.

Acknowledgements

T.A. was a graduate student of the Graduate Research Training Programme No. 705/2 funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. This work has been supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to A.J. and by the NIH grant 1R21AI55464-01 to S.L. and H.J.H. Thanks go to S.L. Guenet, X. Montagutelli and K.W. Broman for excellent statistical advice. The technical assistance of M. Meyer, S. Eghtessadi, I. Trotz, and S. Przyklenk is gratefully acknowledged.

Duality of interest

None of the authors have any duality of interest to declare.

References

- Bach JF (1994) Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15, 516-542
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19, 889-890
- Canzian F (1997) Phylogenetics of the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Genome Res* 7, 262-267
- Castro MA, Nunes RJ, Oliveira MI, Tavares PA, Simoes C, Parnes JR, Moreira A, Carmo AM (2003) OX52 is the rat homologue of CD6: evidence for an effector function in the regulation of CD5 phosphorylation. *J Leukoc Biol* 73, 183-190
- Chang WM, Chen KD, Chen LY, Lai MT, Lai YK (2003) Mitochondrial calcium-mediated reactive oxygen species are essential for the rapid induction of the grp78 gene in 9L rat brain tumour cells. *Cell Signal* 15, 57-64
- Ellerman KE, Like AA (2000) Susceptibility to diabetes is widely distributed in normal class IIu haplotype rats. *Diabetologia* 43, 890-898
- Gimferrer I, Farnos M, Calvo M, Mittelbrunn M, Enrich C, Sanchez-Madrid F, Vives J, Lozano F (2003) The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *J Biol Chem* 278, 8564-8571
- Günther E, Kiesel U, Kolb H, Krawczak M, Rothermel E, Wurst W (1991) Genetic analysis of susceptibility to diabetes mellitus in F2-hybrids between diabetes-prone BB and various MHC-recombinant congenic rat strains. *J Autoimmun* 4, 543-551
- Hedrich HJ (2006). Taxonomie and Stocks and Strains. In *The Laboratory Rat*. Suckow, MA, Weisbroth, SH, Franklin, CL, eds. (Academic press), 71
- Kikutani H, Makino S (1992) The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 51, 285-322
- Lally FJ, Bone AJ (2003). Animal models of type 1 diabetes. In *Textbook of Diabetes*. Pickup, JC, Williams, G, eds. (Blackwell Scientific Publications), 19.11-19.17
- Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11, 241-247

- Lenzen S, Tiedge M, Elsner M, Lortz S, Weiss H, Jörns A, et al. (2001) The LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 44, 1189-1196
- Lindsey JR, Baker HJ (2006). The oldest Rat Stock and the PAR/Lou strain. In *The Laboratory Rat*. Suckow, MA, Weisbroth, SH, Franklin, CL, eds. (Academic Press), 33
- Luo DF, Bui MM, Muir A, Maclaren NK, Thomson G, She JX (1995) Affected-sib-pair mapping of a novel susceptibility gene to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM8) on chromosome 6q25-q27. *Am J Hum Genet* 57, 911-919
- Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B (2002) Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36, 20-42
- Oh-hashii K, Naruse Y, Amaya F, Shimosato G, Tanaka M (2003) Cloning and characterization of a novel GRP78-binding protein in the rat brain. *J Biol Chem* 278, 10531-10537
- Sakata K, Yamashita T, Maeda M, Moriyama Y, Shimada S, Tohyama M (2001) Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem J* 356, 53-60
- Sun NK, Lu HP, Chao CC (2002) Identification of rat DDB1, a putative DNA repair protein, and functional correlation with its damaged-DNA recognition activity. *J Biomed Sci* 9, 371-380
- Weiss H, Bleich A, Hedrich HJ, Kölsch B, Elsner M, Jörns A, Lenzen S, Tiedge M, Wedekind D (2005) Genetic analysis of the LEW.1AR1-*iddm* rat: an animal model for spontaneous diabetes mellitus. *Mamm Genome* 16, 432-441

Tables

Table 1 Mode of inheritance of the *Iddm1*, *Iddm8* and *Iddm9* susceptibility loci in diabetic BN N2 and PAR N2 rats

<i>Iddm9</i> (D1Ztm7)	<i>Iddm8</i> (D1Ztm1)	<i>Iddm1</i> (D20Wox15)	n	Backcross
+/+	+/-	+/+	0	BN N2 n = 14
+/-	+/+	+/+	5	
+/+	+/+	+/-	3	
+/+	+/+	+/+	6	
<i>Iddm9</i>	<i>Iddm8</i> (D1Ztm18)	<i>Iddm1</i> (D20Rat32)		
n.a.	+/-	+/+	2	PAR N2 n = 19
n.a.	+/+	+/-	3	
n.a.	+/+	+/+	14	

Homozygosity and heterozygosity were determined for the peak markers *D1Ztm7* (*Iddm9*), *D1Ztm1* (*Iddm8*), *D20Wox15* (*Iddm1*) for the BN N2 and *D1Ztm18* (*Iddm8*) and *D20Rat32* (*Iddm1*) for PAR N2. +/+ = homozygous, +/- heterozygous, n.a. = not applicable.

Figures

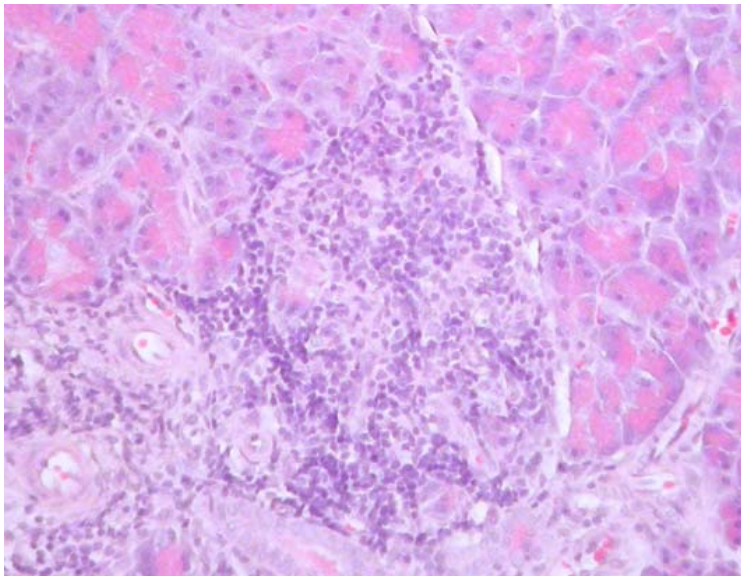


Fig. 1 Infiltrated islet from diabetic PAR N2 rat. Hematoxylin/Eosin staining of pancreas sections from a diabetic PAR N2 rat . The immune cell infiltrate was restricted to the islets migrated from the perivascular space. The densely infiltrated islet of the PAR N2 strain showed the same infiltration pattern as the BN N2 strain (not shown) as well as the spontaneously diabetic LEW.1AR1-*iddm* rat (Weiss et al. 2005). Magnification x 400.

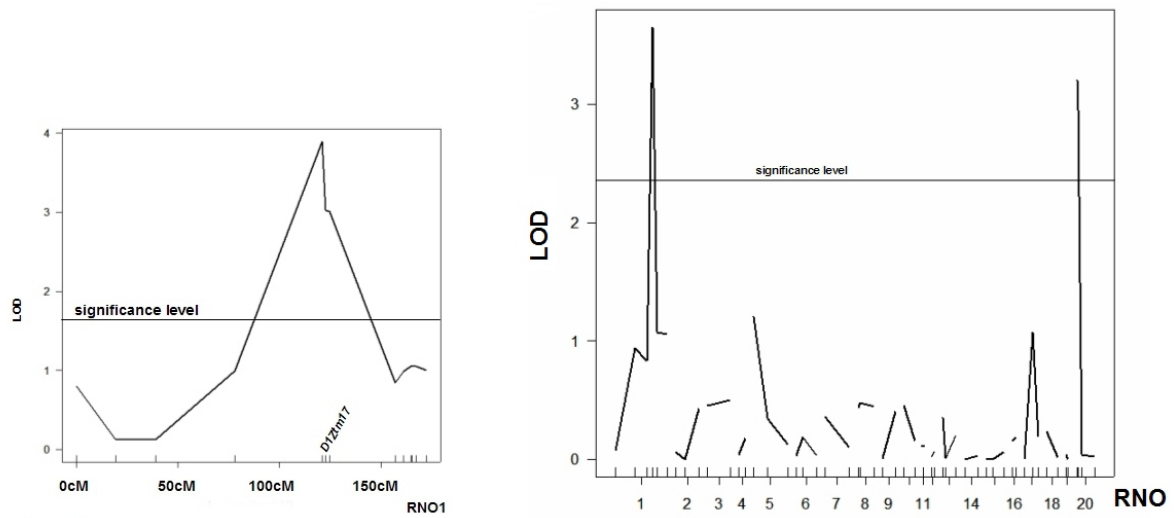


Fig. 2

Fig. 2 Genome-wide and RNO1 spotted mapping of diabetes susceptibility loci of the LEW.1AR1-*iddm* rat. 130 PAR N2 animals were typed using genomic DNA and the complete panel of polymorphic microsatellite markers ($n = 61$) as described in Research Design and Methods. The diabetes incidence of the N2 population was 16 %. The LOD scores of the diabetes susceptibility regions were calculated using the R/qtl program. A permutation test assumed a LOD score > 1.8 to be significantly associated with the diabetic syndrome. The peak marker of the PAR N2, *DIZtm17* shows a LOD score of 3.9 and is located at 120.9cM/213.13Mb.

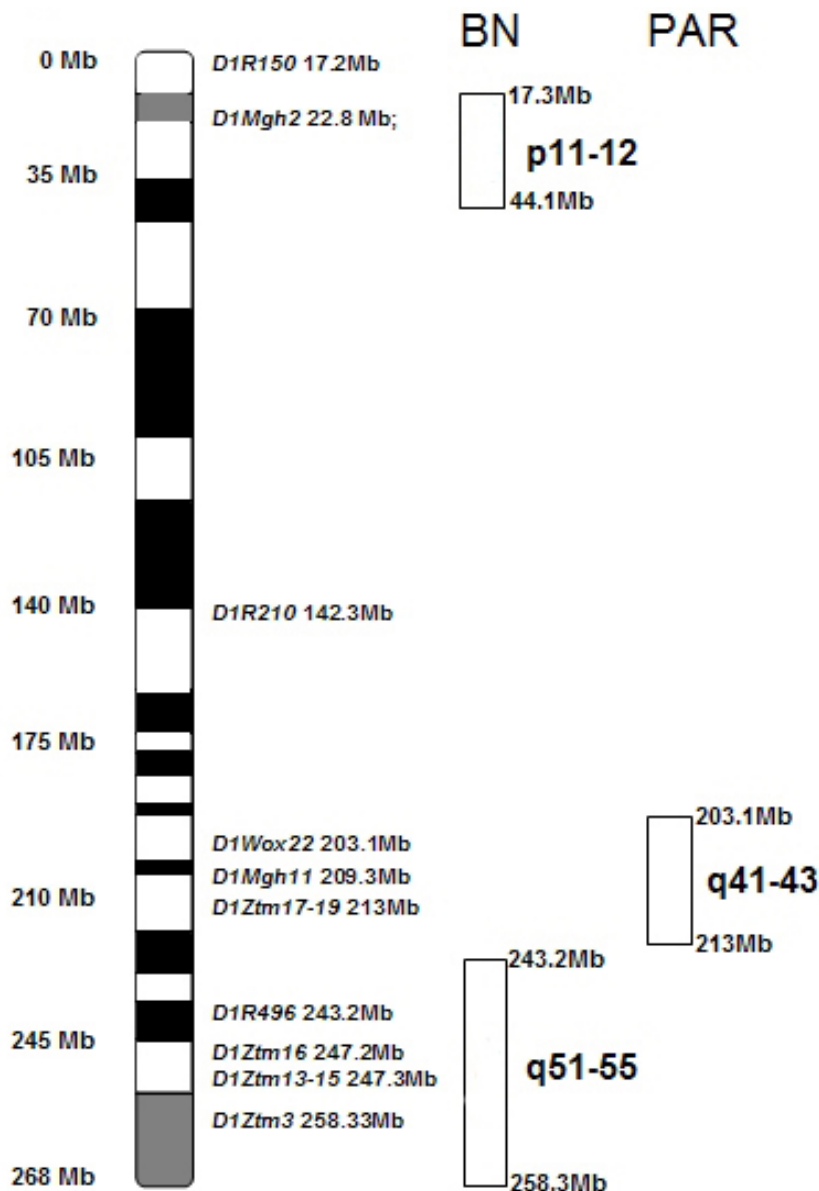


Fig. 3 Physical map of RNO1. The susceptibility regions of the BN N2 and PAR N2 have been assigned to the physical map of the rat. In contrast to the results of the backcross study using the BN animals as intercross partner, the PAR N2 shows only one susceptibility region on RNO1 and lacks the *Iddm9* (17.3Mb – 44.1Mb) locus in the centromeric region. The diabetes susceptibility region of the PAR N2 animals is located in the immediate vicinity of the *Iddm8* (243.2Mb – 258.3Mb) locus.

The mutation of the LEW.1AR1-*iddm* rat causes not only type 1 diabetes mellitus development but also a heterogeneous T-cell content

Short title: Arndt et al: A heterogeneous T-cell content in the LEW.1AR1-*iddm* rat

**Tanja Arndt^{1,2}, Anne Jörns^{1,3}, Sigurd Lenzen¹, Edwin Cuppen⁵, Hans-Jürgen Hedrich²,
Heike Weiss^{1,4}, Markus Tiedge⁴ and Dirk Wedekind²**

¹Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany

²Institute for Laboratory Animal Science, Hannover Medical School, Hannover, Germany

³ Centre of Anatomy, Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁴Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Rostock, Rostock,
Germany

⁵Hubrecht Laboratory, Centre for Biomedical Genetics, Utrecht, Netherlands

June 2008

Address for correspondence:

Dr. D. Wedekind
Institute of Laboratory Animal Science
Hannover Medical School
D-30625 Hannover
Germany
Telephone: + 49/511/5323715
Fax: + 49/511/5323710

Abbreviations: BN N2: [(BN x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2; PAR N2: [(PAR x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2; BB rat: Bio Breeding rat; LETL rat: Long-Evans Tokushima lean rat; KDP rat: Komeda Diabetes Prone rat; NOD mouse: non-obese diabetic mouse; PBL: peripheral blood lymphocytes

Abstract

Background and Aims. The LEW.1AR1-*iddm* rat is an animal model of human type 1 diabetes mellitus (T1DM), which arose through a spontaneous mutation within the MHC-congenic inbred strain LEW.1AR1 (*RT1^{r2}*). Recently, flow cytometry of peripheral blood lymphocytes (PBL) indicated that the T-cell content of LEW.1AR1-*iddm* rats is altered as compared to the background strain LEW.1AR1. The aim of this study was (1) to characterise the lymphocyte repertoire within the PBLs of the diabetes susceptible LEW.1AR1-*iddm* strain and its diabetes resistant control strain LEW.1AR1 and (2) to identify the genetic loci responsible for the phenotype of a heterogeneous CD3⁺ T-cell content detected via FACS analysis.

Materials and Methods. Blood of the two congenic LEW strains, LEW.1AR1-*iddm* (diabetic) and LEW.1AR1 (diabetes resistant), was taken at an age between 55-110 days of life. PBLs were differentiated by flow cytometry using a set of monoclonal antibodies (OX-38 FITC, OX-8 FITC, OX-8 PE, G4.18 PE, R73 FITC, OX-33 FITC, NKR 10/78 FITC, all BD; ED1 FITC). All animals of the two backcross populations, [(PAR x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 rats and [(BN x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 rats, showing extreme variations of the CD3⁺ T-lymphocyte content (> 30% - < 40% or > 60%) were chosen for linkage analysis. In parallel SNPs polymorphic between LEW and PAR/BN were chosen for KASPar analysis to narrow down the already known susceptibility region for T1DM, *Iddm8*.

Results. The LEW.1AR1 strain was characterised by a decrease in the CD3⁺ T-cell content compared to the background strain. The CD4⁺ T-cell content was also decreased while the CD8⁺ T-cell content shows no significant difference. But the whole LEW.1AR1-*iddm* cohort showed strong variations in the T-cell content compared to the LEW.1AR1 rats. The alterations of the T-cell subpopulations of the LEW.1AR1-*iddm* rats lead also to a strong variation of the CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio. The CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio in PBLs of the background strain LEW.1AR1 was much more stable with a mean value of 2.1. The linkage analysis concerning the variable number of T-lymphocytes revealed an association between the phenomenon of variant CD3⁺ T-lymphocytes and the microsatellite marker *D1Rat295* on the telomeric region of chromosome 1 (RNO1) with a LOD score of 11. This region is identical with the already known *Iddm8* region. Using KASPar analyses it was possible to narrow down the *Iddm8* region from 40 Mb to 4 Mb, located at RNO1q51.

Conclusions. The mutation of the LEW.1AR1-*iddm* rat has an effect on the lymphocyte composition of the PBLs at variance from the coisogenic background strain LEW.1AR1. Moreover, it can be postulated that these alterations lead to T1DM development in 60% of the LEW.1AR1-*iddm* colony. Interestingly, recent investigations in diabetic patients also indicate that alterations in the lymphocyte repertoire may play a role in the pathogenesis of human T1DM. Perspectively, the identification of the functional role of the variable T-cell content may help to understand the mechanisms of autoimmunity in T1DM.

Keywords: T1DM, Animal Model, LEW.1AR1-*iddm*, *Iddm8*, heterogeneous T-cell content

Introduction

Insulin-dependent diabetes mellitus Type 1 (T1DM) is a multifactorial disease in which a predisposing genetic background as well as environmental factors ultimately lead to an autoimmune destruction of the pancreatic beta cells (1). Animal models play an important role for the elucidation of the pathogenesis of T1DM because they allow to combine genetic and functional characterisation of the syndrome (2). The LEW.1AR1-*iddm*/Ztm rat is a model for T1DM which arose through a spontaneous mutation in the intra-MHC recombinant inbred strain LEW.1AR1 (*RT1^{r2}*, *RT1-A^a*, *RT1-B/D^u*, *RT1-C^u*) (3). This model shows an apoptotic β -cell destruction, activated by the secretion of proinflammatory cytokines of islet infiltrating immune cells (4). The autoimmune nature of the diabetic syndrome was proven by adoptive transfer experiments (5).

The diabetic syndrome of the LEW.1AR1-*iddm* rat followed an autosomal recessive mode of inheritance with an incomplete penetrance of the mutant phenotype of about 60 %. Recently, three T1DM susceptibility loci in the LEW.1AR1-*iddm* model have been discovered by linkage analysis using a (BN x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm* N2 (6). One of them mapped to RNO20p12 within the MHC region. The MHC (Major Histocompatibility Complex) is described as a chromosomal region providing T1DM susceptibility in humans (*IDDM1*) and animal models, in particular in the NOD mouse (*Idd1*), the BB rat and the KDP rat (*Iddm1*) (7). Thus, the MHC haplotype plays a pivotal role in permitting T1DM development (8).

In the LEW.1AR1-*iddm*/Ztm rat two additional *Iddm* loci reside on RNO1 and have not been described before in rat T1DM models. The *Iddm8* locus has been discovered within RNO1q51 – 55 at the telomeric end and *Iddm9* could be localised in RNO1p11 – 1q11 near the centromer using a [(BN x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 backcross population. In an additional [(PAR x LEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm*] N2 cohort, two diabetes susceptibility genes could be confirmed: *Iddm1* and *Iddm8*. In this backcross it was not possible to identify *Iddm9* (9). The LEW.1AR1-*iddm* rat not only shows the phenotype of T1DM but also of a heterogeneous T-cell content within this group.

In this study the phenotype of the heterogeneous T-cell content of both N2 cohorts has been characterized by genetic analysis to identify the mutated locus causing this phenotype and to analyse if the same mutation causes not only T1DM development but also the heterogeneous T-cell content. Our data provide evidence that a mutation within the *Iddm8* locus on RNO1 not only confers susceptibility to T1DM but also to a heterogeneous T-cell content. With

additional SNP dependent KASPar analyses it was possible to narrow the *Iddm8* region from 40 Mb to 4 Mb.

Research Design and Methods

Animals. To analyse the LEW.1AR1-*iddm* for a susceptibility loci for the heterogeneous T-cell content we created (a) an F1 generation by mating diabetic male LEW.1AR1-*iddm* rats with female BN/Ztm rats (*RT1*) and (b) an F1 generation by mating diabetic male LEW.1AR1-*iddm* rats with female PAR/Ztm (*RT1^g*) rats. Notably, none of the BN/Ztm rats nor the PAR/Ztm rats spontaneously developed diabetes. The female (LEW.1AR1-*iddm* x BN) F1 offspring and female (LEW.1AR1-*iddm* x PAR) F1 offspring were backcrossed to diabetic male LEW.1AR1-*iddm* rats. We analysed 218 BN N2 and 130 PAR N2 animals for genetic characteristics.

All animals were bred under SPF (specific pathogen free) conditions and were later on housed together in the same hygiene unit in the Central Animal Facility of Hannover Medical School (Ztm). They were regularly monitored for infection by typical viral pathogens (Kunstyrr) and were serologically negative for Hanta, Kilham rat, PVM, Reo3, Sendai, SDA, rat corona, Theiler's encephalomyelitis, and Toolan's (H1) viruses. The rats were held in groups of three animals under a 12:12 light-dark cycle, $55 \pm 5\%$ humidity, in type IIR Macrolon cages (910cm², Techniplast 1290 D001, Italy) on a standard softwood bedding (Altromin $\frac{3}{4}$, Germany), with free access to sterilised standard laboratory chow (diet No. 1324, Altromin, Lippe, Germany) and water. All rats were checked for blood glucose levels twice a week until day 120 of live. Blood glucose was measured by the glucose oxidase method (Glucometer Elite, Bayer, Leverkusen, Germany) in blood taken from the tail vein. Diabetic animals were sacrificed within 48 h after onset of hyperglycemia (≥ 10 mmol/l) for preparation of genomic DNA from tail and ear biopsies and tissue samples (spleen, thymus). The same procedure was applied to non-diabetic animals at the age of 120 days. All pancreases of the diabetic animals and of the non-diabetic animals of the backcross population were analysed morphologically for immune cell infiltration.

DNA preparation. Genomic DNA was extracted from the tissues using the NucleoSpin™ Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry. In order to determine the different lymphocyte subpopulations in peripheral blood cells flow trough analyses were performed using the following labelled monoclonal antibodies: The following antibodies were used for flow cytometry: CD4 (OX-38) FITC, CD3 (G4.18) PE, (BD); CD8 (OX-8) FITC, CD8 (OX-8) PE, G4.18 PE, R73 FITC, CD45RA (OX-

33) FITC, NKR (10/78) FITC, ED1 FITC (Serotec, Düsseldorf, Germany), RT6.1 FITC (kindly provided by Dr. K. Wonigeit, Hannover, Germany). In a FACS tube erythrocytes from 70 µl blood were lysed 2-3 times in 2 ml lysis buffer (160 mmol NH₄, 0.1 mmol EDTA, 12 mmol NaHCO₃) and centrifuged (200 x g) for 3 min each. Thereafter the cell pellet was washed twice with FACS buffer (phosphate buffered saline, 0.03 % sodium azide, 0.1 % bovine serum albumin) and centrifuged again. The pellet was resuspended in 20 µl pre-diluted antibody solution and incubated for 20 min at room temperature. After washing the cells twice with 2 ml FACS buffer the cell pellet was resuspended in 200 µl FACS buffer and measured in a flow cytometer (Model FACSCalibur[®], Becton Dickinson). Cell characteristics (size and granularity) and antibody binding of living cells were assessed with a flow cytometer (Becton Dickinson). Data processing was carried out with an Apple Computer using Cellquest 3.0.1 Software. A gate for lymphocytes was created based on size and granularity of peripheral blood cells.

Microsatellite analyses. All oligonucleotide primers used in this study were developed and used as described previously (6; 9).

The PCR reaction was performed according to the manufacturer's instructions (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germany) using 100 µg DNA template/well added to a 96-well plate (MultiRigid Ultra Plates[™], Roth, Karlsruhe, Germany) and amplified in a PTC-200 thermocycler (Biozym, Hess. Oldendorf, Germany). The amplification consisted of the following steps: 4 min at 94°C; 35 cycles: 15 s at 94°C, 1 min at 55°C with exception of *DIZtm1* (57°C) and *DIZtm2* (53.2°C), 2 min at 72°C; 7 min final extension at 72°C. PCR products were analysed by electrophoresis in 3 % Nusieve[™] agarose gels (Biozym, Hess. Oldendorf, Germany). Gels were stained using Gelstar[™] (Cambrex, Apen, Germany) and documented by UV light illumination at 312 nm.

KASPar analyses. SNPs within the *Iddm8* region were selected based on new informative markers as described before (10) (CASCAD SNPview [<http://cascaad.niob.knaw.nl/snpview/>]). For a set of 30 SNPs each, polymorphic between BN vs. LEW and PAR vs. LEW, primers were designed for KASPar genotyping using a tool provided by Kbioscience (Primer picker [<http://kbioscience.co.uk/primer-picker/>]) based on the snp locus sequence (about 50 nt flanking each side of the SNP are required for design). The output provide sequence information for two allele-specific oligonucleotides of about 40 nt in length and 1 common oligonucleotide of about 20 nt in length, all of which are standard unmodified and unlabelled oligonucleotides. The three oligonucleotides for each assay were dissolved in 10 mM Tris-Hcl

(pH 8) to a 100 μ M concentration, mixed together as a SNP assay mix (12 μ l AS1 + 12 μ l AS2 + 30 μ l CP + 46 μ l Tris-HCl pH 8) and 2 μ l aliquots were distributed into individual wells of 384 well plates by a Tecan Robot (see above). Assay plates were frozen at -20°C until use. Each SNP was typed in a total volume of 4 μ l in the following reaction mixture: 6 ng DNA, 22 mM MgCl_2 , Ktaq, 1 μ l 4x reaction mix, 2 μ l pre-plated assay mix according to manufacturer's guidelines (Kbioscience). Amplification was performed in Applied Biosystems GeneAmp 9700 thermocyclers running the following program: 94°C – 15 min then 20 cycles of 94°C – 10 sec, 57°C – 5 sec and 72°C – 10 sec, followed by 18 cycles of 94°C – 15 min then 20 cycles of 94°C – 10 sec, 57°C – 20 sec and 72°C – 40 sec. Fluorescence scanning of the reactions was done in a BMG labtech Pherastar scanner and the results were interpreted by the KlusterCaller 1.1 software (Kbioscience). Per 384 well plate, all SNPs are amplified for a single individual and afterwards all data for each locus is regrouped for all samples by a custom Perl script before interpretation by KlusterCaller.

Statistical analyses. Linkage analysis was performed using the JoinMap V 2.0 program (Agricultural Research Department, Wageningen, Netherlands). The LOD scores of the susceptibility regions for the heterogeneous T-cell content were calculated using the R/qtl program provided by Dr. K. Browman (Department of Biostatistics, Johns Hopkins University, Baltimore, MD) (11). E/M algorithms estimated susceptibility regions in a binary model using the T-cell content (T-cell content < 40 %) of the animals as a trait. A permutation test was performed to calculate the threshold value for significance (LOD score > 2.3) (12).

Results

Content of peripheral blood T-lymphocytes (PBL) in the LEW.1AR1-*iddm* (LEW.1AR1-*iddm* *, diabetic and LEW.1AR1-*iddm*, non-diabetic) rats and the background strain LEW.1AR1. The percentage of T-cells in PBLs within the LEW.1AR1 rat population varied between 63 % and 74 % (mean \pm SEM: 69 ± 1 %, coefficient of variation (CV): 5.23) (Fig. 1). In contrast, the variability of the T-cell content in PBLs within the LEW.1AR1-*iddm* population is very high and significant differences of the mean percentage could be detected not only between the inbred strains LEW.1AR1 and LEW.1AR1-*iddm*, but also between the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group and the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group (Fig. 1). The percentage of T-cells in PBLs within the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group was in a range of 34 % to 63 % (mean \pm SEM: 51 ± 1 %, $p < 0.0001$, CV: 15.84), while the content of T-cells in PBLs within the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group varied between 36 % and 80 % (mean \pm SEM: 59 ± 2 %, $p < 0.02$, CV: 22.94). Additionally, a significant decrease of T-cells could

be observed in the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group compared to the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group ($p < 0.004$), but the variation in both groups was equal. All diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats were in the age range of 50 –88 days and all non-diabetic animals were in the age range of 55 –110 days.

The percentage of CD4⁺ T-cells in PBLs within the LEW.1AR1 rat population varies between 42 % and 51 % (mean \pm SEM: 46 ± 1 %, CV: 5.99) (Fig. 2). In contrast, the variability of the T-cell content in PBLs within the LEW.1AR1-*iddm* population was very high and significant differences of the mean percentage could be detected not only between the inbred strains LEW.1AR1 and LEW.1AR1-*iddm*, but also between the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group and the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group (Fig. 2). The percentage of T-cells in PBLs within the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group was in a range of 10 % to 45 % (mean \pm SEM: 30 ± 1 %, $p < 0.0001$, CV: 23.19), while the content of T-cells in PBLs within the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group varied between 19 % and 52 % (mean \pm SEM: 36 ± 2 %, $p < 0.001$, CV: 28.33). Additionally, a significant decrease of T-cells could be observed in the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group compared to the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group ($p < 0.02$), but the variation in both groups is equal.

The percentage of CD8⁺ T-cells in PBLs within the LEW.1AR1 population varied between 20 % and 25 % (mean \pm SEM: 22 ± 0 %, CV: 6.87) (Fig. 2). In contrast, the variability of the T-cell content in PBLs within the LEW.1AR1-*iddm* population was very high but no significant differences of the mean percentage could be detected between the inbred strains LEW.1AR1 and LEW.1AR1-*iddm* (Fig. 2). The percentage of T-cells in PBLs within the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group was in a range between 3 % and 27 % (mean \pm SEM: 19 ± 1 %, CV: 30.43), while the content of T-cells in PBLs within the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group varied between 12 % and 44 % (mean \pm SEM: 23 ± 1 %, CV: 34.78). But a significant decrease of T-cells could be observed in the diabetic LEW.1AR1-*iddm* group compared to the non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group ($p < 0.02$), but the variation in both groups was equal.

Ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells in PBLs of LEW.1AR1 and LEW.1AR1-*iddm* rats. The CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio in PBLs of diabetes resistant LEW.1AR1 rats is on average 2.1 ± 0 with a maximum of 2.3 and a minimum of 1.9 (Fig. 3). The diabetic LEW.1AR1-*iddm* group had a significantly lower CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio within PBLs (mean \pm SEM: 1.5 ± 0.1 , $p < 0.001$), but the variability within the group was much higher (0.9 to 2.0, CV: 22.42) compared with the coisogenic LEW.1AR1 strain (mean \pm SEM: 2.1 ± 0.3 , CV: 4.81) (Fig. 3). There was

no difference in the variability of the CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio in PBLs between the diabetic and non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* group. Interestingly, the mean value of the CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio (1.7 ± 0.1 , $p < 0.02$) was significantly higher in non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats than in diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats.

Distribution and inheritance of the T-cell content variability in peripheral blood lymphocytes (PBLs) within different rat inbred strains, intercrosses and backcrosses. As described before the variance of the T-cell content in PBLs within the cohort of the mutated LEW.1AR1-*iddm* rats ($n = 66$) (CV: 21.36) was significantly higher compared to that of the LEW.1AR1 group ($n = 12$) (CV: 5.23) ($p = 0.01$, Fig. 4). The mean of the T-cell content in the F1 animals of a LEW.1AR1-*iddm* x LEW.1AR1 cross as well as the variation (mean \pm SEM: $69 \pm 2\%$, CV: 7.19) ($n = 10$) did not differ from the background strain, indicating a autosomal recessive mode of inheritance.

Although the inbred strains LEW.1AR1, BN, and PAR differ in their average T-cell content within peripheral blood lymphocytes there was an equal variance of the T-cell content upon flow cytometric analysis across these three strains (LEW.1AR1: mean \pm SEM: $69 \pm 1\%$, CV: 5.23; BN: mean \pm SEM: $38 \pm 1\%$, CV: 8.31; PAR: mean \pm SEM: $52 \pm 2\%$, CV: 8.97) (CV: $p \geq 0.5$). Also the intercrosses BN x LEW.1AR1-*iddm* and PAR x LEW.1AR1-*iddm* showed a homogeneity of the T-cell content ($p \geq 0.5$). The content of T-cells in PBLs of BN rats was $38 \pm 1\%$ (CV: 8.31) (Fig.4), while the (BN x LEW.1AR1-*iddm*)F1 progeny showed $46 \pm 3\%$ T-cells in PBLs (CV: 12.44) (Fig.4). The content of T-cells in PBLs of PAR rats was $52 \pm 2\%$ (CV: 8.97) (Fig. 4), while the (PAR x LEW.1AR1-*iddm*) F1 progeny showed $46 \pm 2\%$ T-cells in PBLs (CV: 11.7) (Fig. 4). The content and the variance in both F1 cohorts did not differ significantly from the BN/PAR rats but from the LEW.1AR1-*iddm* rats, indicating again a recessive mode of inheritance.

For mapping the causative mutation a (BN x LEW.1AR1-*iddm*) F1 x LEW.1AR1-*iddm* N2 population ($n = 100$) and a (PAR x LEW.1AR1-*iddm*) F1 x LEW.1AR1-*iddm* N2 population ($n = 103$) was generated. According to the Mendelian rules it could be expected that 50 % of the N2 population display a disturbed content of T-cells in PBLs. In fact, the percentage of T-cells varied continuously between 26 and 72 % with a mean of $44 \pm 2\%$ (CV: 20.21) in the (BN x LEW.1AR1-*iddm*) F1 x LEW.1AR1-*iddm* N2 population and between 21 and 76 % with a mean of $40 \pm 1\%$ (CV: 25.96 %) in the (PAR x LEW.1AR1-*iddm*) F1 x LEW.1AR1-*iddm* N2 population (Fig.4). In both cases the coefficient of variation differed from the F1 population and was identical with the LEW.1AR1-*iddm* rats. Because of the great variations,

it was difficult to discriminate affected and unaffected rats displaying about 50 % T-cells in PBLs. However, N2 animals with a content of T-cells < 50 % and > 65 % were chosen as homozygous for the mutation and rats with 60 % to 65 % were used as heterozygous.

Association of microsatellite markers with the diabetic syndrome and T-cell content in PBLs. 157 previously described markers with an intermarker distance of about 20 cM (6; 9) were used for mapping the phenotype of the heterogeneous T-cell content within PBLs of the LEW.1AR1-*iddm* rat strain. In these regions of interest a denser mapping was performed using microsatellite markers with a intermarker distance of about 1 cM.

Linkage analysis of the trait “heterogeneous T-cell content” in a (BNxLEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm* N2 cohort (n=100) showed one susceptibility locus, while for the trait “T1DM” two susceptibility loci have been mapped on RNO1, *Iddm8* and *Iddm9* (6) (Fig. 5, continuous line). The peak of this QTL analysis lied within the already known *Iddm8* region on the telomeric end of RNO1 at about 145 cM (dashed line). The linkage analysis of a (PARxLEW.1AR1-*iddm*) x LEW.1AR1-*iddm* N2 population (n=100) showed only one T1DM susceptibility locus in the rat, identical with *Iddm8* (9) (Fig.6, continuous line). In this BC population the peak of the QTL analysis of the trait “heterogeneous T-cell content” could also be identified within the *Iddm8* region on the telomeric end of RNO1 at about 120 cM (dashed line, Fig. 6). Thus the mutation seems to cause not only T1DM manifestation but also the heterogeneous T-cell content.

KASPar analysis. In this *Iddm8* region we looked for SNP polymorphisms between LEW and BN or PAR. Experiments were performed with 12 markers for the BN BC und 15 markers for the PAR BC population. All diabetic animals were analysed for these markers whether they are homozygous or heterozygous. Because the mutation is autosomal recessive we looked for the region which is homozygous for LEW. Both BC populations showed no homozygous region yet but the data allowed the assumption that one region will become homozygous after analysis of some additional SNP markers. In the PAR BC population there was a region with only one heterozygous animal between the SNP on 224128466 Mb and the SNP on 227335895 Mb. Thus we assume that the mutation is lying within this region of the 4 Mb, on RNO1q51. The BN BC population shows a similar region with only two heterozygous animals between SNP on 223474188 Mb und SNP on 250015295 Mb. Here we have found one additional region at the telomeric part of the RNO1, starting with the SNP on 256049463 Mb. These results are in accordance with those of an earlier microsatellite marker analysis (6).

Discussion

In the LEW.1AR1-*iddm* model susceptibility to T1DM follows an autosomal recessive mode of inheritance. Since this rat model is bred as an inbred strain, all animals carry the mutation but only 60 % develop diabetes (incomplete penetrance). These animals show not only the phenotype of T1DM but also a heterogeneous T-cell content. In this study we phenotyped the LEW.1AR1-*iddm* rat for the “heterogeneous T-cell content”. Subsequent genotyping via linkage analysis showed the region of the mutation responsible for both phenotypes.

Content of peripheral blood T-lymphocytes (PBL) in the LEW.1AR1-*iddm* (LEW.1AR1-*iddm* *, diabetic and LEW.1AR1-*iddm*, non-diabetic) rats and the background strain LEW.1AR1. Flow cytometric analysis showed a significant difference in the immunological milieu within the PBLs of LEW.1AR1-*iddm* rats compared to the coisogenic background strain, LEW.1AR1. LEW.1AR1-*iddm* rats showed not only a significant reduction in the CD3⁺ T-cell content compared to the background strain, but also a strong variability between 34 % and 80 % within the whole population. Diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats showed a significantly lower CD3⁺ T-cell content than non-diabetic rats. It was not possible to find a correlation between age and T-cell content.

Changes in the CD3⁺ T-cell content could be attributed mainly to a reduction in the CD4⁺ T-cell content (30 %) compared to the background strain (46 %). The CD8⁺ T-cell content showed no significant differences. Indeed both T-cell subpopulations, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, showed strong variabilities in the T-cell content compared to the LEW.1AR1 rats.

So far the LEW.1AR1-*iddm* rat has been considered to be immunocompetent because in contrast to other animal models of human T1DM it shows no considerable immune defects. The NOD mouse shows in parallel to the diabetes manifestation a lot of additional congenital defects of the immune system leading to a shift of potential autoreactive T-cells into the periphery and therefore also into the islets. In particular a defect of antigen presenting cells has been considered to be responsible for a disturbance of tolerance development (13; 14). Moreover, functional defects in T-cells as well as apoptotic signalling in were found (15). The BB rat shows lymphopenia of peripheral T-cells as well as a dysfunction of all remaining cells (16), which is obligatory for diabetes manifestation in this animal model (17-19). A mutation of the *Lyp* locus is responsible for the severe loss of peripheral T-cells which has been found in all homozygous animals (20). This is the most important difference compared to the human T1DM (21). In the KDP rat a mutation has been found in the *Cblb* gene (22; 23) which has an important influence on T-cell activation and therefore has been considered to be the trigger of

T1DM development within the KDP rat. There is no other information available on the immune status of these rats so far.

These defects found in inbred strains differ strongly from the situation in humans. In contrast several studies have shown that the distribution of peripheral T-cells is impaired in humans with diabetes, both at diagnosis and during the course of the disease (24; 25). Similar to the LEW.1AR1-*iddm* rat changes in lymphocyte subsets have been described in human T1DM as well as T2DM (26-29). But it has been discussed controversially which subpopulation is increased or decreased (30-34). Therefore, different changes in the immune system apparently contribute to T1DM manifestation in humans but they are all based on changes in T-cell distribution.

Normally, lymphocyte numbers are stringently regulated, so that the size of the peripheral pool is stable throughout life (35). T-cell deviation by “basal proliferation” (36) or “spontaneous proliferation” (37) is minimal. In contrast, the homeostatic proliferation or “lymphopenia-induced proliferation” (38) describes controlled expansion of T-cells. Critical signals for this T-cell expansion are space, contact with MHC/peptide complexes (39) and cytokine stimulation. Studies in the NOD mouse have shown that islet-specific T-cells are generated preferentially. Excess of IL-21 limited survival of T-cells, resulting in recurrent stimulation of T-cells specific for self-peptide/MHC-complexes (40). Interestingly, changes in T-cell subsets have not only been found in humans and other murine T1DM models but also in diabetic dogs (41).

Ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells in PBLs of LEW.1AR1 and LEW.1AR1-*iddm* rats. Changes analysed in the T-cell content of the LEW.1AR1-*iddm* population have a direct effect on the CD4⁺/CD8⁺ ratio. Thus, in our animal model we also found a reduced mean ratio of CD4⁺/CD8⁺ T-cells in diabetic and normoglycemic LEW.1AR1-*iddm* rats traced back rather to changes in the CD4⁺ T-cell population than in the CD8⁺ T-cell population. Here again the variability within the LEW.1AR1-*iddm* cohort is much higher than in the background strain. Furthermore differences between normoglycemic and diabetic animals become apparent.

The ratio of CD4⁺/CD8⁺ T-cells is an important diagnostic marker of the function of the immune system, while the ratio is strain specific. Our LEW.1AR1 rat has a CD4⁺/CD8⁺ ratio of 2:1 while the BB rat shows a ratio of 3:1 (42). The ratio in the NOD mouse is 2.5. Interestingly, there is an increase of the CD4⁺/CD8⁺ ratio only after onset of insulinitis but after diabetes manifestation the ratio returns to normal. However, the absolute number of T-cells is reduced (43; 44).

In humans an inverted ratio is characteristic for an intense immune response such as graft vs host disease or HIV infection (31). A change in the CD4⁺/CD8⁺ ratio has also been described in diabetic patients. Patients with diabetes show a lower CD4⁺/CD8⁺ ratio differing from that in healthy control patients (26; 45), which is in agreement with our results. These data indicate a change in the immunological balance, with a reduction in the CD4⁺ T-cells followed by a reduction of the CD4⁺/CD8⁺ ratio, which may play an important role in T1DM development. However, the reason for this imbalance is still unknown.

Inheritance of variability of the T-cell content. The CD4⁺/CD8⁺ ratio is highly heritable with genetic factors demonstrated in a study on adolescent twins (46). Other studies have shown that the respective changes in T-cell content are also found in non-diabetic relatives (28; 47). In addition, there are more studies in mice (48) and men (49) which suggested that the trait is under control of a major gene. One major trait locus for the CD4⁺/CD8⁺ ratio in humans is located in chromosome 11p (46). This region is homologous to RNO1 and RNO3. It is likely that it is the same gene which causes changes in T-cell content in humans and rats.

Genotyping of the “heterogeneous T-cell content.” Through linkage analyses using microsatellite markers it was possible to identify the *Iddm8* locus within the telomeric end of RNO1 as susceptibility region not only within the BN but also in the PAR backcross population. Our data clearly favour the *Iddm8* locus as the candidate locus for mutations causing not only autoimmune diabetes but also a heterogeneous T-cell content in the whole LEW.1AR1-*iddm* population. Because until recently not enough polymorphic microsatellite markers have been available, it was not possible to narrow down the *Iddm8* region. However, during the last year the group of Edwin Cuppen identified a number of polymorphic SNPs between different rat strains (10). Through KASPar analyses it was possible to narrow this susceptibility loci from 40 Mb to 4 Mb. This new smaller region is in agreement with RNO1q51. This region contains genes such as *Hmgb1* (*High-mobility group box 1*), *Gda* (*Guanin deaminase*) or *Anxa1* (*annexin A1*) which are interesting candidates for diabetes manifestation.

Hmgb1 has initially been identified as a DNA-binding protein acting as a cofactor for the correct regulation of transcription. Extracellular *Hmgb1* acts as a proinflammatory cytokine, which is involved in the pathogenesis of different inflammatory and infectious diseases (50). New studies in the NOD mouse show that extracellular *Hmgb1* acts as a strong immunomediator involved in progression of insulinitis and T1DM onset (51). But in the region RNO1q51 there are still more genes with unknown function.

The identification of the gene responsible for diabetes manifestation will ultimately allow a better understanding of the processes leading to autoimmune destruction of beta cells in humans since the LEW.1AR1-*iddm* model shares many similarities with human T1DM.

Acknowledgements

T.A. was a graduate student of the Graduate Research Training Programme No. 705/2 funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. This work has been supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to A.J. and by the NIH grant 1R21AI55464-01 to S.L. and H.J.H. The technical assistance of M. Meyer, S. Eghtessadi, I. Trotz, and S. Przyklenk is gratefully acknowledged.

References

1. Bach JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15:516-542, 1994
2. Lally FJ, Bone AJ: Animal models of type 1 diabetes. In *Textbook of Diabetes*, 3. ed. Pickup JC, Williams G, Eds. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 2003, p. 19.11-19.17
3. Lenzen S, Tiedge M, Elsner M, Lortz S, Weiss H, Jörns A, Klöppel G, Wedekind D, Prokop CM, Hedrich HJ: The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:1189-1196, 2001
4. Jörns A, Günther A, Hedrich HJ, Wedekind D, Tiedge M, Lenzen S: Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes* 54:2041-2052, 2005
5. Wedekind D, Weiss H, Jorns A, Lenzen S, Tiedge M, Hedrich HJ: Effects of polyinosinic-polycytidylic acid and adoptive transfer of immune cells in the Lew.1AR1-iddm rat and in its coisogenic LEW.1AR1 background strain. *Autoimmunity* 38:265-275, 2005
6. Weiss H, Bleich A, Hedrich HJ, Kolsch B, Elsner M, Jörns A, Lenzen S, Tiedge M, Wedekind D: Genetic analysis of the LEW.1AR1-iddm rat: an animal model for spontaneous diabetes mellitus. *Mamm Genome* 16:432-441, 2005
7. Pickup JC, Williams G: *Textbook of diabetes*, Blackwell Scientific Publications, 2003
8. Ellerman KE, Like AA: Susceptibility to diabetes is widely distributed in normal class IIu haplotype rats. *Diabetologia* 43:890-898, 2000
9. Weiss H, Arndt T, Jorns A, Lenzen S, Cuppen E, Hedrich HJ, Tiedge M, Wedekind D: The mutation of the LEW.1AR1-iddm rat maps to the telomeric end of rat chromosome 1. *Mamm Genome* 19:292-297, 2008
10. Nijman IJ, Kuipers S, Verheul M, Guryev V, Cuppen E: A genome-wide SNP panel for mapping and association studies in the rat. *BMC Genomics* 9:95, 2008
11. Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA: R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889-890, 2003
12. Churchill GA, Doerge RW: Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963-971, 1994
13. Serreze DV: Autoimmune diabetes results from genetic defects manifest by antigen presenting cells. *Faseb J* 7:1092-1096, 1993
14. Serreze DV, Gaskins HR, Leiter EH: Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *J Immunol* 150:2534-2543, 1993
15. Kishimoto H, Sprent J: A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* 2:1025-1031, 2001
16. Bellgrau D, Naji A, Silvers WK, Markmann JF, Barker CF: Spontaneous diabetes in BB rats: evidence for a T cell dependent immune response defect. *Diabetologia* 23:359-364, 1982
17. Guttman RD, Colle E, Michel F, Seemayer T: Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. II. T lymphopenia and its association with clinical disease and pancreatic lymphocytic infiltration. *J Immunol* 130:1732-1735, 1983

18. Jackson RA, Buse JB, Rifai R, Pelletier D, Milford EL, Carpenter CB, Eisenbarth GS, Williams RM: Two genes required for diabetes in BB rats. Evidence from cyclical intercrosses and backcrosses. *J Exp Med* 159:1629-1636, 1984
19. Klötting I, Vogt L, Serikawa T: Locus on chromosome 18 cosegregates with diabetes in the BB/OK rat subline. *Diabete Metab* 21:338-344., 1995
20. Elder ME, Maclaren NK: Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat. *J Immunol* 130:1723-1731, 1983
21. Klötting I, Kovacs P, Kuttler B: Phenotypic consequences after restoration of lymphopenia in the diabetes-prone BB/OK rat. *Biochem Biophys Res Commun* 239:106-110, 1997
22. Yokoi N, Kanazawa M, Kitada K, Tanaka A, Kanazawa Y, Suda S, Ito H, Serikawa T, Komeda K: A non-MHC locus essential for autoimmune type I diabetes in the Komeda Diabetes-Prone rat. *J Clin Invest* 100:2015-2021, 1997
23. Yokoi N, Komeda K, Wang HY, Yano H, Kitada K, Saitoh Y, Seino Y, Yasuda K, Serikawa T, Seino S: Cblb is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. *Nat Genet* 31:391-394, 2002
24. Petersen LD, Duinkerken G, Bruining GJ, van Lier RA, de Vries RR, Roep BO: Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 9:731-737, 1996
25. Roep BO: The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 46:305-321, 2003
26. Faustman D, Eisenbarth G, Daley J, Breitmeyer J: Abnormal T-lymphocyte subsets in type I diabetes. *Diabetes* 38:1462-1468, 1989
27. Herold KC, Huen A, Gould L, Traisman H, Rubenstein AH: Alterations in lymphocyte subpopulations in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: exploration of possible mechanisms and relationships to autoimmune phenomena. *Diabetologia* 27 Suppl:102-105, 1984
28. Kaaba SA, Al-Harbi SA: Abnormal lymphocyte subsets in Kuwaiti patients with type-1 insulin-dependent diabetes mellitus and their first-degree relatives. *Immunol Lett* 47:209-213, 1995
29. Kimura M, Tanaka S, Isoda F, Sekigawa K, Yamakawa T, Sekihara H: T lymphopenia in obese diabetic (db/db) mice is non-selective and thymus independent. *Life Sci* 62:1243-1250, 1998
30. Legendre CM, Schiffrin A, Weitzner G, Colle E, Guttman RD: Two-color flow cytometry analysis of activated T-lymphocyte subsets in type I diabetes mellitus. *Diabetes* 37:792-795, 1988
31. Pedersen C, Dickmeiss E, Gaub J, Ryder LP, Platz P, Lindhardt BO, Lundgren JD: T-cell subset alterations and lymphocyte responsiveness to mitogens and antigen during severe primary infection with HIV: a case series of seven consecutive HIV seroconverters. *Aids* 4:523-526, 1990
32. Pontesilli O, Chase HP, Carotenuto P, Herberger MJ, Hayward AR: T-lymphocyte subpopulations in insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 63:68-72, 1986
33. Richens ER, Jones WG: T-lymphocyte subpopulations in type I diabetes mellitus. A longitudinal study. *Acta Diabetol Lat* 22:229-238, 1985

34. Spooren PF, Vermes I, Soons JW: Similar alterations of lymphocyte subpopulations in type I and type II diabetes. *Neth J Med* 42:163-167, 1993
35. Van Parijs L, Abbas AK: Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280:243-248, 1998
36. Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, Benoist C, Mathis D, Butz EA: Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195:1515-1522, 2002
37. Min B, Foucras G, Meier-Schellersheim M, Paul WE: Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3874-3879, 2004
38. Schuler T, Hammerling GJ, Arnold B: Cutting edge: IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD8+ T cells in neonatal mice allows the generation of long-lived natural memory T cells. *J Immunol* 172:15-19, 2004
39. Prlic M, Jameson SC: Homeostatic expansion versus antigen-driven proliferation: common ends by different means? *Microbes Infect* 4:531-537, 2002
40. Marleau AM, Sarvetnick N: T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J Leukoc Biol* 78:575-584, 2005
41. Mori A, Sagara F, Shimizu S, Mizutani H, Sako T, Hirose H, Yoshimura I, Uematsu Y, Yamaguchi T, Arai T: Changes in peripheral lymphocyte subsets in the type 1 diabetic dogs treated with insulin injections. *J Vet Med Sci* 70:185-187, 2008
42. Whalen BJ, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA: Adoptive transfer of autoimmune diabetes mellitus to athymic rats: synergy of CD4+ and CD8+ T cells and prevention by RT6+ T cells. *J Autoimmun* 7:819-831, 1994
43. Reddy S, Wu D, Swinney C, Elliott RB: Immunohistochemical analyses of pancreatic macrophages and CD4 and CD8 T cell subsets prior to and following diabetes in the NOD mouse. *Pancreas* 11:16-25, 1995
44. Zhang ZL, Constantinou D, Mandel TE, Georgiou HM: Lymphocyte subsets in thymus and peripheral lymphoid tissues of aging and diabetic NOD mice. *Autoimmunity* 17:41-48, 1994
45. Lapolla A, Dalfrà MG, Sanzari M, Fedele D, Betterle C, Masin M, Zanchetta R, Faggian D, Masotti M, Nucera V, Plebani M: Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine* 31:280-287, 2005
46. Evans DM, Zhu G, Duffy DL, Frazer IH, Montgomery GW, Martin NG: A major quantitative trait locus for CD4-CD8 ratio is located on chromosome 11. *Genes Immun* 5:548-552, 2004
47. Peakman M, Warnock T, Vats A, McNab GL, Underhill J, Donaldson PT, Vergani D: Lymphocyte subset abnormalities, autoantibodies and their relationship with HLA DR types in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes and their first degree relatives. *Diabetologia* 37:155-165, 1994
48. Kraal G, Weissman IL, Butcher EC: Genetic control of T-cell subset representation in inbred mice. *Immunogenetics* 18:585-592, 1983
49. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, Chieco-Bianchi L: Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1:1279-1283, 1995

-
50. Ulloa L, Messmer D: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:189-201, 2006
 51. Han J, Zhong J, Wei W, Wang Y, Huang Y, Yang P, Purohit S, Dong Z, Wang MH, She JX, Gong F, Stern DM, Wang CY: Extracellular HMGB1 acts as an innate immune-mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes*, 2008

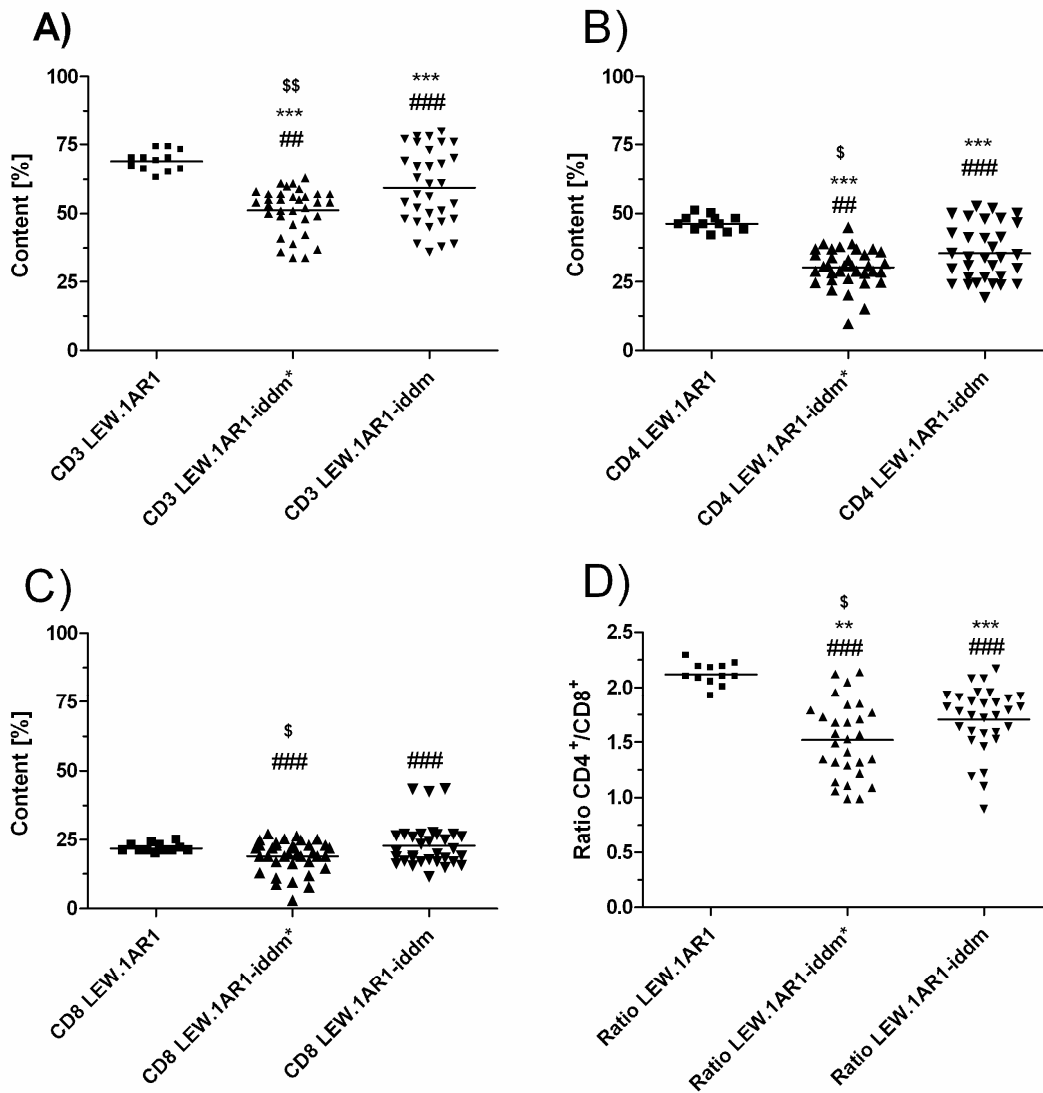


Fig. 1. T-cell content within BPLs of LEW.1AR1 rats and LEW.1AR1-iddm rats (* = diabetic animals) rats and the backgroundstrain. The CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell content was measured by flow cytometric analysis. All animals were in an age between 35 und 110 days. (A) The mean content of CD3⁺ T-cells in all diabetic and non-diabetic LEW.1AR1-iddm rats was significantly reduced compared with the background strain. The variation of the T-cell content within PBLs of LEW.1AR1-iddm rats was significantly increased compared to the LEW.1AR1 rats. (B) The mean content of CD4⁺ T-cells in all diabetic and non-diabetic LEW.1AR1-iddm rats was significantly reduced compared with the background strain. The variation of the T-cell content within PBLs of LEW.1AR1-iddm rats was significantly increased compared to the LEW.1AR1 rats. (C) The mean content of CD8⁺ T-cells in all diabetic and non-diabetic LEW.1AR1-iddm rats was not reduced compared with the background strain. The variation of the T-cell content within PBLs of LEW.1AR1-iddm rats was significantly increased compared to the LEW.1AR1 rats. (D) The mean content of

the ratio of CD4⁺/CD8⁺ T-cells in all diabetic and non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats was significantly reduced compared with the background strain. The variation of the ratio within PBLs of LEW.1AR1-*iddm* rats was significantly increased compared to the LEW.1AR1 rats. T-cell content and the ratio is shown as mean value \pm SEM: *p < 0.05 LEW.1AR1-*iddm* rats compared to the background strain LEW.1AR1, \$p < 0.05 diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats compared to non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats (ANOVA plus Bonferroni post test); #p < 0.05 variance compared to LEW.1AR rats (students t-test with Welch's correction).

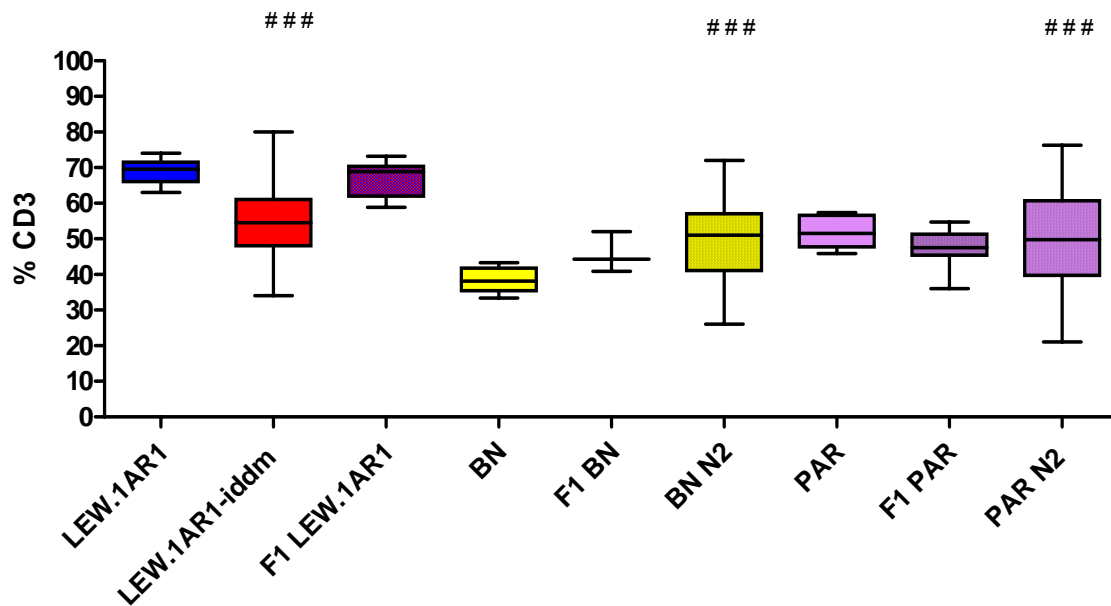


Fig. 2. Variance of the T-cell content in peripheral blood lymphocytes (PBL) of different rat strains and crosses. The variance of the T-cell content in PBLs was not equal across the LEW.1AR1 and LEW.1AR1-*iddm* cohorts. The variance of the T-cell content in PBLs was not equal across the BN, BNxLEW.1AR1-*iddm* F1, and the BNxLEW.1AR1-*iddm* x LEW.1AR1-*iddm* BC1 cohorts. The variance was not equal across the PAR, PARxLEW.1AR1-*iddm* F1, and the PARxLEW.1AR1-*iddm* x LEW.1AR1-*iddm* BC1 cohorts. The variance of T-cells is heritable independent from the genetic background of the breeding partners. The T-cell content of the animals depends on the genetic background, but the variance can be attributed to the mutation. # $p < 0.05$ variance compared to LEW.1AR rats (students t-test with Welch's correction).

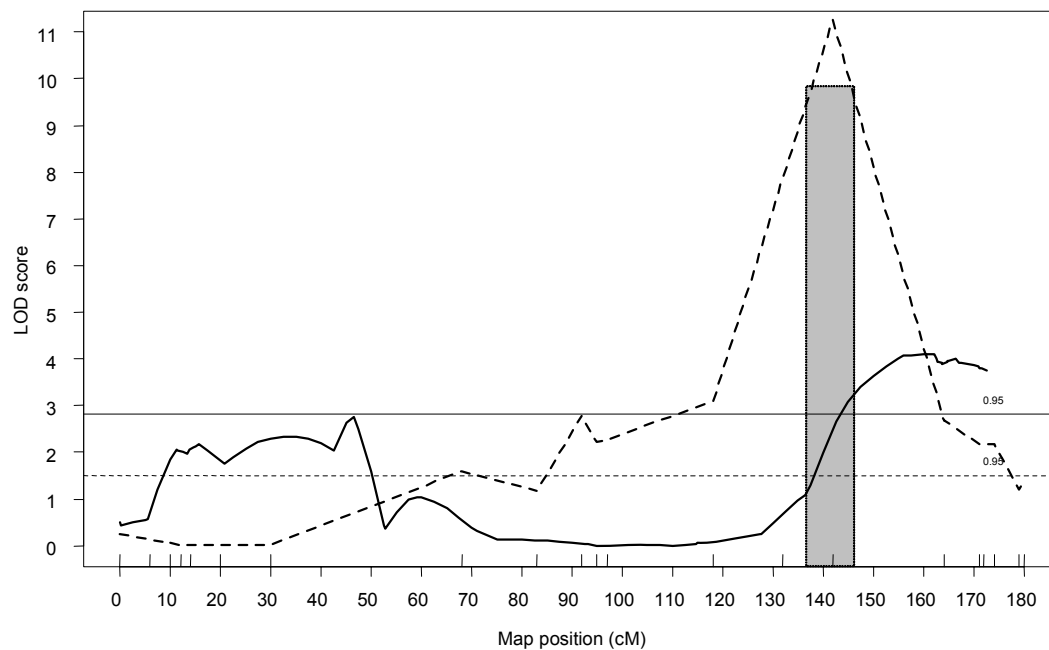


Fig. 3. Association of microsatellite markers on RNO1 with diabetes (drawn through curve) and T-cell content in PBLs (dashed curve) in the (BN x LEW.1AR1-*iddm*) F1 x LEW.1AR1-*iddm* BC1. LOD scores were estimated using E/M algorithms. A permutation test considered a LOD score of > 2.3 as significant for association with diabetes (through drawn line) and a LOD score of > 2.8 as significant for association with T-cell content (dashed line).

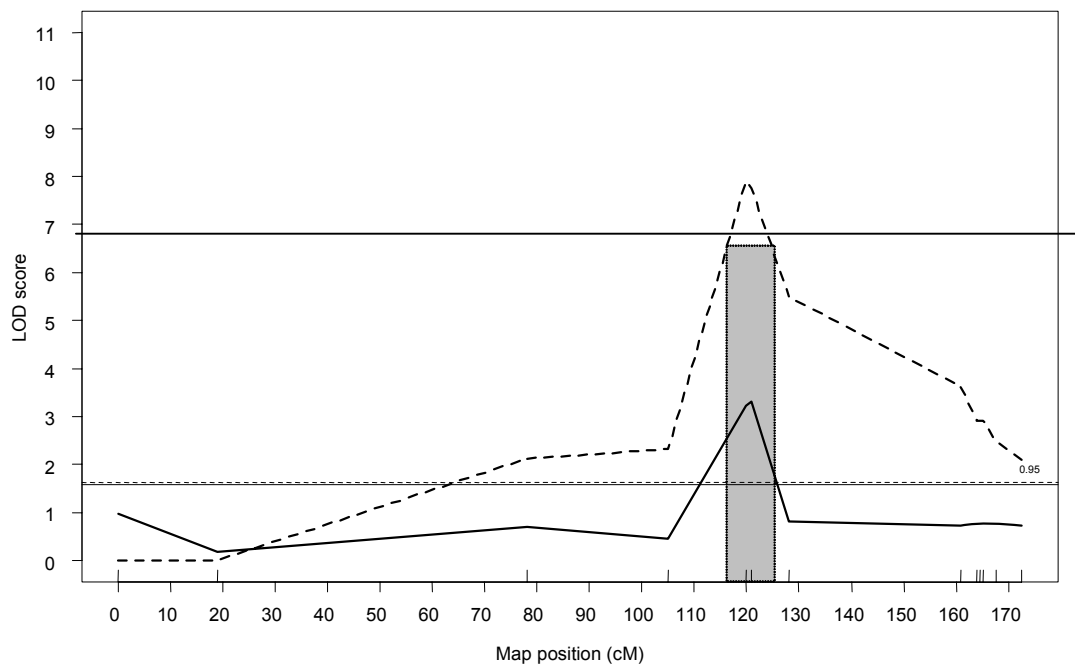


Fig. 4. Association of microsatellite markers on RNO1 with diabetes (drawn through curve) and T-cell content in PBLs (dashed curve) in the (PAR x LEW.1AR1-*iddm*) F1 x LEW.1AR1-*iddm* BC1. LOD scores were estimated using E/M algorithms. A permutation test considered a LOD score of > 2.3 as significant for association with diabetes (through drawn line) and a LOD score of > 2.8 as significant for association with T-cell content (dashed line).

**Prevention of type 1 diabetes development in the
LEW.1AR1-*iddm* rat is mediated by selective CD8⁺ T-cell
transfer inducing a cytokine shift in the pancreas draining
lymph nodes**

short running title: Protective role of CD8⁺ T-cells in type 1 diabetes
(42 characters)

**Tanja Arndt,^{1,2} * Dirk Wedekind,² * Heike Weiss,^{1,4} Markus Tiedge,⁴ Sigurd Lenzen,¹
Hans-Jürgen Hedrich,² and Anne Jörns^{1,3}**

From the

¹ Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany;

² Institute of Laboratory Animal Science, Hannover Medical School, Hannover, Germany;

³ the Centre of Anatomy, Hannover Medical School, Hannover, Germany ; and the

⁴ Institute of Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Rostock,
Rostock, Germany.

June 2008

* Both authors equally contributed to this work

Address correspondence and reprint requests to:

Prof. Anne Jörns
Institute of Clinical Biochemistry
Hannover Medical School
D-30625 Hannover, Germany
Phone: +49/511/5326526
Fax: +49/511/5323584
E-mail: joerns.anne@mh-hannover.de

IDDM rat, LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rat; BB-DP rat, Biobreeding rat diabetes prone; Treg, regulatory T-cells; NOD mouse, nonobese diabetic mouse; T1DM, Type 1 diabetes mellitus; CD, Cluster of Differentiation; FoxP3, Forkhead box protein 3

Abstract

Objective - The LEW.1AR1-*iddm* rat is an animal model of spontaneous type 1 diabetes mellitus (T1DM). This study analysed the potential of T-cell subpopulations to induce and to prevent diabetes.

Research Design and Methods - CD4⁺ or CD8⁺ T-cells were isolated from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats or diabetes-resistant LEW.1AR1 rats. Cells were selectively transferred into athymic LEW.1AR1-*Whn*^{tmu} or pre -diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. The animals were monitored for blood glucose, islet infiltration and immune cell composition of draining pancreatic lymph nodes.

Results - After adoptive transfer of CD4⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into athymic LEW.1AR1-*Whn*^{tmu} rats 50% of the recipients developed diabetes while transfer of CD8⁺ T-cells failed to induce diabetes. Only 10% of the athymic recipients became diabetic after co-transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Adoptive transfer of CD8⁺ T-cells from LEW.1AR1 or diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into non-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats significantly reduced the incidence of diabetes. In protected normoglycemic animals the regulatory T-cell subpopulations CD8⁺/CD25⁺ and CD4⁺/CD25⁺, co-expressing FoxP3, accumulated in the pancreas draining lymph nodes. Additionally, gene expression of the anti-inflammatory cytokine IL-4 was significantly higher than in diabetic rats.

Conclusions - Our results show that adoptive transfer of CD4⁺ but not CD8⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats induced diabetes development. Importantly, CD8⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats and diabetes-resistant LEW.1AR1 rats provided protection against beta cell destruction. The accumulation of regulatory T-cells in the pancreas draining lymph nodes from protected rats indicates that regulatory CD8⁺ T-cells may have beneficial effects in the control of beta cell autoimmunity.

Introduction

The LEW.1AR1-*iddm* (LEW.1AR1/Ztm-*iddm*) rat is an animal model of autoimmune diabetes with characteristics resembling human type 1 diabetes mellitus (T1DM) (1). At variance from other established rodent models such as the BB-DP rat and the NOD mouse it develops the diabetic syndrome without lymphopenia or without an immune defect in the NK/T-lymphocyte population (1). The LEW.1AR1-*iddm* rat originated from the MHC-coisogenic inbred strain LEW.1AR1 expressing the recombinant Mhc haplotype RT^2 : $RT1-A^a B/D^u C^u$. Tl class II(*u*) alleles have been demonstrated to confer susceptibility to experimentally induced T1DM in concert with auto-reactive cells and triggering events (2). Adoptive transfer of T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats to pre-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats (I0 generation, diabetes incidence 30%) significantly increased the incidence of diabetes (3) in agreement with studies on NOD mice and BB-DP rats (4-9). The auto-reactive potential can be transferred through immune cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{mu}* animals, but not to the diabetes-resistant LEW.1AR1 background strain (3). On the other hand, it was possible to confer protection against diabetes through adoptive transfer of immune cells from the LEW.1AR1 background strain into pre-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats (3). Thus, regulatory elements of the cellular immune system apparently protect LEW.1AR1 rats against beta cell auto-reactive immune cells. However, the specific roles of different T-cell subpopulations in this (im)balance between auto-aggression and protection are so far unknown. To address this issue we performed adoptive transfer experiments using purified CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats and diabetes-resistant LEW.1AR1 rats to elucidate the auto-reactive or protective potential of these T-cells. We transferred T-cell subpopulations from spontaneously diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{mu}* animals to identify the auto-reactive potential of different cell populations. For analysis of the regulatory potential we transferred T-cell subpopulations from the diabetes-resistant LEW.1AR1 background strain into pre-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. To verify the potential of regulatory T-cell subpopulations after onset of diabetes we also transferred these cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. The localization of regulatory T-cell subpopulations was examined in different secondary lymphoid tissues and in the islet infiltrate. Our data provide evidence that T-cells from the CD8⁺ subpopulation confer protection after transfer into prediabetic rats. In accordance with recent reports upon CD3 antibody intervention in diabetic patients regulatory CD8⁺ T cells may play a pivotal role in the control of auto-aggressive immune cells in T1DM (10).

Research Design and Methods

Animals. Diabetes-prone LEW.1AR1-*iddm* rats, diabetes-resistant LEW.1AR1 rats and athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* rats were housed in the Central Animal Facility of Hannover Medical School (Ztm). All animals were maintained and regularly monitored for murine pathogens to document the health status as described before (3). Breeding conditions for the LEW.1AR1-*iddm* colony and the athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* rats used for the transfer experiments were as described (3).

Adoptive transfer of T-cells. Lymph nodes (cervical and mesenteric) and spleen from donor rats were removed, minced, processed into single-cell suspensions and separated for T-cell subpopulation analyses by means of a magnetic cell bead separation technique (11).

CD8⁺ T-cells were labeled with unconjugated CD8 β -mAb (clone RPA-T8, mouse IgG1) for 30 min on ice. After two washing steps, the anti-CD8 β mAb-labelled T-cells were incubated for 15 min with rat anti-mouse IgG1 paramagnetic microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) at 4°C. Thereafter, bound CD8⁺ cells were separated on MS columns using the MACS™ technology according to the protocol of the supplier (Miltenyi Biotech). For isolation of CD4⁺ T-cells, cells were directly incubated with anti-rat CD4 microbeads (Miltenyi Biotech) for 15 min at 4°C. After two washing steps, cells were separated using MS depletion columns as described for CD8⁺ T-cells. The cell suspensions were cultured with concanavalin A (ConA) (Biochrom, Berlin, Germany) directly or after isolation of specific T-cell subpopulations as described before (3) to obtain a sufficient number of T-cells for transfer in non-irradiated animals. The purity of each T-cell population was determined by flow cytometry before and after stimulation with ConA and was consistently > 97%. The following antibodies were used for flow cytometry: CD4 (OX-38) FITC, CD3 (G4.18) PE, (BD); CD8 (OX-8) FITC, CD8 (OX-8) PE, G4.18 PE, R73 FITC, CD45RA (OX-33) FITC, NKR (10/78) FITC, ED1 FITC (all from Serotec, Düsseldorf, Germany). To determine the regulatory and auto-aggressive potential, two different adoptive transfer protocols were used: (a) Cells were transferred from diabetic LEW.1AR1-*iddm* donors into athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* rats between day 33 and 85 of life; (b) cells were transferred from diabetes-resistant LEW.1AR1 or diabetic LEW.1AR1-*iddm* donors into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* rats at day 30 of life. LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* and prediabetic LEW.1AR1-*iddm* rats received the following ConA stimulated immune cells: (a) Pan T-cells (10 x 10⁶ cells), (b) CD4⁺ T-cells (5 x 10⁶ cells), (c) CD8⁺ T-cells (3 x 10⁶ cells) and (d) CD4⁺ T-cells (5 x 10⁶ cells) combined with CD8⁺ T-cells

(3×10^6 cells). All transfer experiments were approved by the respective state committees on animal welfare.

Blood glucose monitoring. Blood glucose concentrations were determined twice weekly in blood collected from the tail vein (3). Rats were killed at the day of diabetes manifestation (threshold value > 7.5 mmol/l). There was no sex preference in diabetes incidence in any of the experimental groups. After adoptive transfer normoglycemic animals were sacrificed at day 120.

Morphology of pancreas, pancreas-draining peripheral lymph nodes, and spleen.

Pancreas and the secondary lymphoid organs were removed, fixed and immunostained by the avidin-biotin-complex (ABC) method or fluorescence method by light microscopy as previously described (1). The following polyclonal and monoclonal antibodies were used to identify the beta cells and immune cells: rat insulin (A565, DAKO, Hamburg, Germany, 1:500), macrophages (ED1; MCA 341), B-cells (IgD, 189), pan-T-cells (R 73, MCA 453), CD4⁺ T-cells (MCA 55), CD8⁺ T-cells (β -chain, MCA 938,), IL-2R (α -chain, CD25, MCA 494), NK cells (CD 161, MCA 1427) (all from Serotec, Düsseldorf, Germany) and the forkhead box protein 3 (FoxP3) antibody (Nanotec, Frankfurt, Germany).

In situ RT-PCR. Sections from the pancreas draining lymph nodes were fixed on 3-Chamber SuperFrost Plus™ slides and subjected for *in situ* RT-PCR gene expression analysis using a two step protocol with reverse transcription and PCR amplification on a specific thermal cycler (PTC-200 Twin Tower DNA Engine, MJ Research, Waltham, MA) as described in detail before (12). The primer sequences were:

rat IL-1 β	sense	GATGTTCCATTAGACAGCTGCACTG
	antisense	CTTTTCCATCTTCTTCTTTGGGTATTGT
rat TNF- α	sense	CTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTC
	antisense	CTGGTATGAAGTGGCAAATCGGCT
rat IFN- γ	sense	GCTCTGCCTCATGGCCCTCTC
	antisense	TGTTGCTGATGGCCTGGTTGTC
rat IL-4	sense	TCTCAGCCCCACCTTGCTG
	antisense	TTGCGAAGCACCTGGAAGC
rat IL-10	sense	TGCACCCACTTCCCAGTCAGC
	antisense	CACCTGCTCCACTGCCTTGC
β -actin	sense	ACAGCTGAGAGGGAAATCGT
	antisense	CTGCTTGCTGATCCACATCT
TGF- β	sense	TATAGCAACAATTCCTGGCGTTACCT
	Antisense	AAGGGTCGGTTCATGTCATGGATG

Real time RT-PCR. mRNA from isolated immune cells before and after stimulation with ConA from animals of the background strain or from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats was reverse transcribed using random hexamer primers. Expression of CD25, FoxP3, CD134 and β -actin was quantified by the QuantiTect SYBR GreenTM technology (QIAGEN, Hilden, Germany) using a microplate-based DNA Engine OpticonTM fluorescence detection system (MJ Research, Waltham, MA) as described previously (12). The primer sequences were:

CD25	sense	CCACACTTGCTGATGTTGGGGT
	antisense	AGAGGGCTTTGAACGTGGCATT
FoxP3	sense	AGCTTGTTTGCTGTGCGGAGAC
	antisense	AAGGGGGCCGCATATTATGGTA
CD134	sense	ACCCAGTGGTCACAAGTGCTG
	antisense	AGAAGCCAGCGTCACATGGATG
β -Actin	sense	GAACACGGCATTGTCACCAACTGG
	antisense	GGCCACACGCAGCTCATTGTA

Statistics. Differences between diabetes incidences were analyzed by the χ^2 and log-rank test assuming a significance level of 0.05 as significant. All other quantitative data are presented as mean values \pm S.E. and were analyzed by ANOVA plus Bonferroni's post test using the Prism 5 program (Graphpad Inc., San Diego, CA).

Results

Effect of T-cell subpopulations on diabetes incidence and age of manifestation in athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{mmu}* rats. To test the effect of an adoptive transfer against the background of a defective cellular immune system, 10×10^6 pan T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats were adoptively transferred into athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{mmu}* rats. All athymic recipient rats (14/14), irrespective of their age at lymphocyte transfer (33 - 85 days), developed diabetes 44 ± 5 days after transfer of pan T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* donor rats (Table 1). These data demonstrate the autoaggressive potential of T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats, which clearly induced insulinitis (Table 1) in athymic recipients which are T-cell deficient (3).

To analyse which T-cell subpopulation possesses auto-aggressive potential, CD4⁺ or CD8⁺ T-cell populations were isolated from diabetic animals. Purity of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations was determined before and after ConA stimulation by flow cytometry and was consistently > 97 %. After transfer of 5×10^6 CD4⁺ T-cells, 50% of the athymic recipient rats developed diabetes (Table 1). The manifestation of the disease was significantly delayed to 72 ± 10 days after immune cell transfer as compared to the transfer of pan T-cells (44 ± 5 days; Table 1, Fig. 1). On the other hand, it was not possible to transfer diabetes with 3×10^6 cells CD8⁺ T-cells alone (Table 1). The transfer of a higher number of CD8⁺ T-cells (5×10^6 cells) as used by the specific CD4 transfer also failed to cause diabetes (data not shown). After combined transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells at a ratio of 2:1 (corresponding to the natural distribution), only 10 % of the recipients developed diabetes (Table 1). Again, the manifestation of the disease was delayed in these recipients (Table 1, Fig. 1). Thus, the diabetes incidence was significantly lower after combined transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells as compared to transfer of CD4⁺ T-cells alone or pan T-cells (Table 2). These data indicate that (a) diabetes is mainly conferred by transfer of the CD4⁺ T-cell subpopulation and (b) that transfer of the CD8⁺ T-cell subpopulation has a protective potential rather than a cytotoxic effect.

Effects of T-cells on immune cell infiltration of islets in LEW.1AR1-*Whn^{mmu}*. All animals with persistent normoglycemia after adoptive transfer of T-cells showed well-preserved islets, with no signs of immune cell infiltration (not shown). Islets from LEW.1AR1-*Whn^{mmu}* recipients, which developed diabetes after transfer of pan T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* donors, showed typical signs of infiltration with insulinitis scores indistinguishable from the infiltration in spontaneously diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats (Table 1). Infiltrating cells

could be identified immunohistochemically as macrophages (30-40 %) and T-cells (55-65 %), the latter composed of both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations at an approximate ratio of 2:1. NK-cells and B-cells comprised < 10 % of infiltrating immune cells. Selective transfer of CD4⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* donors resulted in a comparable infiltration pattern in LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* rats that developed diabetes (Fig. 4D-F). Notably, the weak immunostaining of CD8⁺ T-cells in islet infiltrates indicates that this immune cell subpopulation likely originated from the LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* recipients (Fig. 4D) (13; 14). Although the combined transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats to LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* recipients resulted in a low diabetes incidence of 10 % the islets of the diabetic recipients showed severe insulinitis with a score of 3 (Table 1).

Effects of T-cells from diabetes-resistant LEW.1AR1 rats on diabetes incidence and age of manifestation in LEW.1AR1-*iddm* rats. When pan T-cells from diabetes-resistant LEW.1AR1 donor rats were transferred to pre-diabetic LEW.1AR1-*iddm* recipients at day 30 the diabetes incidence significantly decreased from 60 to 30 % (Table 2, Fig. 2A). The age of diabetes manifestation was not significantly affected in the range between 54 and 65 days (Table 2, Fig. 2A). Diabetic animals showed an average insulinitis score of 1.7 (Table 2).

After transfer of 5×10^6 purified CD4⁺ T-cells 55 % of the LEW.1AR1-*iddm* rats developed diabetes, which was not different from the 60 % incidence in the control cohort (Table 2, Fig. 2B). The insulinitis score was 2.3 comprising infiltration by CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells and macrophages (Table 2, Fig. 4A-C). The transfer of a combination of 3×10^6 CD8⁺ T-cells and 5×10^6 CD4⁺ T-cells did also not affect the diabetes incidence and insulinitis score (Table 2, Fig. 2B). Notably, after transfer of CD8⁺ T-cells alone diabetes incidence was significantly decreased to 38 % as compared to spontaneous diabetes in the control cohort without differences in the delay of disease manifestation and insulinitis score (Table 2, Fig. 2A and 2B).

Effects of T-cells from diabetic rats on diabetes incidence and immune cell infiltration of islets in LEW.1AR1-*iddm* rats. To test the regulatory potential of immune cells after onset of diabetes we also transferred CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into prediabetic animals of the same strain. Transfer of the CD4⁺ population resulted in a diabetes incidence of 60 %, which was not different from control animals with spontaneous development of diabetes (Fig. 3). Rats which received CD8⁺ T-cells showed a significantly ($p < 0.05$) lower diabetes incidence of 20 %. The age of disease manifestation was significantly delayed compared to the control cohort (Table 2, Fig. 3), but the selective transfer of CD8⁺ T-cells did not affect the degree of islet infiltration in diabetic animals. Thus, *ex vivo* expanded

CD8⁺ T-cells from diabetic animals may have a regulatory potential, which is able to confer protection against autoimmune attack (Table 2, Fig. 3).

In the next step we analyzed the immune cell repertoire in secondary lymphoid tissues from transferred animals. Pancreas draining lymph nodes of animals after CD8⁺ and CD4⁺ T-cell transfer showed differences in the content of regulatory T-cells whereas the distribution of the other immune cell subpopulations in other lymph nodes or the spleen remained unchanged. Pancreas draining lymph nodes of non-diabetic animals after transfer of CD8⁺ T-cells revealed in the cortical and medullary region a significant increase of CD25 co-expressing CD8⁺ and CD4⁺ T-cells (Fig. 5A and 5B). The values of CD8⁺/CD25⁺ T-cells were $56.2 \pm 3.6/500 \mu\text{m}^2$ and CD4⁺/CD25⁺ T-cells $32.6 \pm 2.1/500 \mu\text{m}^2$. Using an additional immunostaining for FoxP3 an increase of regulatory T-cells could be confirmed after CD8⁺, but not after CD4⁺ T-cell transfer (Fig. S1A – S1D). After transfer of CD8⁺ T-cells both subpopulations of regulatory T-cells (n=3) decreased significantly (CD8⁺/CD25⁺ T-cells $15.2 \pm 1.6/500 \mu\text{m}^2$ and CD4⁺/CD25⁺ T-cells $8.6 \pm 1.3/500 \mu\text{m}^2$) in diabetic animals. In contrast transfer of CD4⁺ T-cells resulted in low densities of CD8⁺/CD25⁺ T-cells and CD4⁺/CD25⁺ T-cells ($9.8 \pm 0.4/500 \mu\text{m}^2$ for CD8⁺/CD25⁺ T-cells and of $7.4 \pm 1.2/500 \mu\text{m}^2$ for CD4⁺/CD25⁺ T-cells) in pancreas draining lymph nodes irrespective of the metabolic state of the animals (n=5) (Fig. 5C and 5D). Non-diabetic animals after CD8⁺ T-cell transfer (Fig. 5E and 5F) showed a higher gene expression level of all anti-inflammatory cytokines, especially IL-4, in comparison to diabetic animals after CD8⁺ and CD4⁺ T-cell transfer (Fig. 5G and 5H) whereas the gene expression of all proinflammatory cytokines, notably TNF- α , showed opposite changes (Fig. 5F and 5H). Thus, the expression pattern indicates a shift away from pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines as potential mediators for the suppressive function of regulatory T-cells in pancreas draining lymph nodes. Notably, in the spleen and peripheral lymph nodes FoxP3 expressing CD8⁺/CD25⁺ and CD4⁺/CD25⁺ T-cells were only rarely detectable ($< 5 \text{ cells}/500 \mu\text{m}^2$) irrespective of the T-cell subpopulation transferred.

Gene expression of regulatory T-cell markers in isolated immune cells from diabetes-resistant LEW.1AR1 and diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. To characterize the potential of regulatory T-cells in normoglycemic LEW.1AR1 and diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats we quantified gene expression of CD25, CD134 and FoxP3 in isolated immune cells (spleen and lymph nodes) before and after stimulation with ConA (Table 3). Immune cells from diabetes-resistant LEW.1AR1 rats showed a higher expression level of CD25 and FoxP3 in the absence of ConA (Table 3) while the expression of CD134 remains equal in both groups without ConA stimulation (Table 3). After stimulation with ConA there was a higher gene

expression of CD134 in both groups (Table 3). Stimulation with ConA resulted in a significant increase of CD25 expression in immune cells from LEW.1AR1 and diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats (Table 3). Thus, the expression of CD25 and FoxP3 is higher in LEW.1AR1 rats irrespective of stimulation by ConA. ConA stimulation resulted in a higher increase of FoxP3 expression in immune cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats than LEW.1AR1 rats. These gene expression data indicate that (a) the expression of Treg markers is higher in immune cells from diabetes-resistant LEW.1AR1 rats, (b) stimulation with ConA increases the expression of Treg markers preferentially in immune cells from LEW.1AR1-*iddm* rats. After ConA stimulation there is neither a preferential stimulation of markers from regulatory nor than autoaggressive T-cells.

Discussion

In the present study we investigated how T-cell subpopulations from diabetic and non-diabetic donors affect diabetes incidence in athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* and pre-diabetic LEW.1AR1-*iddm* recipient rats. There is general consensus that transfer of autoaggressive T-cells results in an increased diabetes incidence in BB-DP rats and NOD mice (4-9). In T1DM patients both auto-aggressive and regulatory activities have been identified within CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations (10; 15-18). In BB-DP rats and NOD mice regulatory capacities could be detected within CD4⁺ T-cell populations, while CD8⁺ T-cells mostly appear to be autoaggressive *in vivo* (19; 20). On the other hand, regulatory properties of CD8⁺ T-cells in animal models have been observed in graft vs host reactions, tumor development and autoimmune diseases (21-23). Although there is evidence that T1DM is the result of an imbalance between autoaggressive and regulatory T-cells, it is still open which subpopulations may precisely confer beta cell destruction or protection (4; 20; 24; 25).

CD8⁺ T-cells confer protection against diabetes. In agreement with previous observations pan T-cells (CD4:CD8 ratio 2:1) from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats induced diabetes in all athymic LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* recipients (3). These data demonstrate the autoaggressive potential of the immune cells from diabetic donors. Selective transfer of CD4⁺ T-cells alone or in combination with CD8⁺ T-cells resulted in development of diabetes with a delayed manifestation of the disease in athymic recipients. Thus, transferred CD4⁺ T-cells initiate the autoimmune process supported by additional costimulatory factors, which could increase diabetes incidence to 100 % in the immunodeficient microenvironment of LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* rats.

The results indicate that in the LEW.1AR1-*iddm* model CD8⁺ T-cell subpopulations contain regulatory CD8⁺ T-cells, which can counteract the autoaggressive potential of CD4⁺ T-cells from diabetic rats when co-transferred into immunodeficient LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* recipients. This assumption is supported by the fact that transfer of CD8⁺ T-cells from diabetes-resistant LEW.1AR1 rats and diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats to prediabetic LEW.1AR1-*iddm* rats also significantly reduced the diabetes incidence.

However, in the BB-DP rat and the NOD mouse models adoptive transfer and selective depletion of T-cell subpopulations have shown that CD8⁺ T-cells aggravate beta cell destruction alone or in a synergistic manner with CD4⁺ T-cells (4; 8; 24; 26-29). These apparent discrepancies are most likely explained by the activation status of effector and regulatory T-cells in the transferred cell population. Gene expression analysis of isolated immune cells from spleen and lymph nodes provide evidence that expression of the regulatory T-cell marker CD25 and FoxP3 are higher in diabetes-resistant LEW.1AR1 than in diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. On the other hand stimulation by ConA increased the expression more effectively in LEW.1AR1-*iddm* rats which could explain that CD8⁺ regulatory T-cells from diabetic rats provided protection against auto-aggressive effector T-cells comparable to adoptive transfers from the LEW.1AR1 background strain. On the other hand, ConA stimulation did not activate CD134 which is a member of the TNFR-superfamily. The balance between autoaggressive effector cells and regulatory T-cells will then crucially determine if adoptive transfer of T-cell leads to beta cell destruction or protection.

Here, it could be argued that *ex vivo* an incomplete co-activation of effector cells from diabetic donors by antigen presenting cells may be responsible for the low diabetes incidence after transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* recipients. There is no doubt from the pattern of islet infiltration that CD8⁺ effector T-cells participate in the destruction of beta cells in the LEW.1AR1-*iddm* model. However, the purification of T-cells favors regulatory characteristics within the CD8⁺ subpopulation probably due to an *ex vivo* milieu defined by residual antigen presenting cells, the cytokine pattern and mitogenic stimulation by ConA. Thus, our experimental protocol is not directly comparable to the situation in the NOD mouse and BB rat models with respect to the balance between regulatory and effector T-cells in isolated immune cells (30-32). In BB rats and NOD mice regulatory T-cells were identified in the CD4⁺/CD25⁺ cell fraction and in the *in vivo* situation; thus, there may be specific differences in the immune system which affect the balance between regulatory and effector immune cells in these models (30; 33). The fact that transfer of CD4⁺ T-cells could not provide protection against diabetes in the LEW.1AR1-*iddm* model does not argue against a

protective role of regulatory CD4⁺/CD25⁺ cells, but rather indicates that under our specific conditions these cells were not able to counteract effector T-cells.

Interestingly, our transfer data suggest that regulatory CD8⁺ T-cells are still present in diabetic rats. The regulatory potential of CD8⁺ T-cells is supported by (a) the decrease of the diabetes incidence from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into pre-diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats and (b) by a lower diabetes incidence after a combined transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into athymic nude LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* rats.

Regulatory potential of CD8⁺ T-cells. It is well-known that tissue-specific autoimmunity can be inhibited by CD4⁺ T-cell subpopulations such as CD4⁺/CD25⁺ with additional markers assigned to T-regs like CD45RC^{low} (34), Nrp1 (Neuropilin-1) (35), FoxP3 (36) or RT6a⁺ (8; 37). The RT6a⁺ expression does play an important role in diabetes development in BB rats (8). Regulatory CD4⁺ T-cells confer protection against autoimmune diabetes in mice, rats, and humans (15; 31; 36; 38).

At first glance it is an unexpected result that transfer of CD8⁺ T-cells from diabetic and normoglycemic donors was able to reduce the diabetes incidence in LEW.1AR1-*iddm* rats. In NOD mice, however, it has been reported that *in vitro* transduction of immune cells with FoxP3 can induce both regulatory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations (39). Furthermore, inhibitory interaction between regulatory CD8⁺ T-cells and autoreactive CD4⁺ T-cells is also known in experimental autoimmune encephalomyelitis (23; 40) and other autoimmune diseases (15; 16; 41).

We could identify intriguing changes of regulatory T-cells in pancreas draining lymph nodes from normoglycemic LEW.1AR1-*iddm* rats only after transfer of CD8⁺ T-cells. It could be demonstrated that both regulatory CD8⁺/CD25⁺ and CD4⁺/CD25⁺ T-cells co-expressing FoxP3 (42) were resident in the pancreas draining lymph nodes in a significantly higher number than in diabetic animals. For regulatory CD4⁺ T-cells it has been postulated that they act on effector cells through a cytokine mediated mechanism (42; 43). Cytokine gene expression analyses in the pancreas draining lymph nodes after transfer of CD8⁺ T-cells clearly showed a reduction of pro-inflammatory cytokines and an increase of anti-inflammatory cytokines, especially IL-4, in protected non-diabetic animals. The postulated function of regulatory T-cells, mediated by IL-4, IL-10 and TGF-β, could be identified as possible mediators in the pancreas draining lymph nodes (42-44). Regulatory CD8⁺ T-cells can suppress activated CD4⁺ T-cells and B-cells through interaction with the MHC class I molecule, which is a well-known susceptibility locus in humans, rats and mice (45; 46).

Notably, the regulatory potential of CD8⁺ T-cells was retained also after diabetes manifestation in the LEW.1AR1-*iddm* rats and was transferable to prediabetic LEW.1AR1-*iddm* rats with a protective effect in these animals, as documented by a reduction of the diabetes incidence from 60 % to 20 % after transfer. The clinical relevance of regulatory CD8⁺ T-cells could be convincingly demonstrated in an intervention study with anti-CD3 mAb in T1DM patients resulting in a preservation of C-peptide protein (10). In this study, anti-CD3 treatment induced CD8⁺/CD25⁺ T-cells, which could inhibit the response of CD4⁺ T-cells to specific antigens under *in vitro* conditions (10).

Perspective. The protective effect of CD8⁺ T-cells in LEW.1AR1-*iddm* rats mirrors the situation observed after anti-CD3 mAb intervention in diabetic humans. Thus, the LEW.1AR1-*iddm* rat may serve as a useful model to study the characteristics and the dynamics of regulatory CD8⁺ T-cells. For patients with diabetes it is highly encouraging that the cellular immune system of the diabetic individual still bears the potential to counteract autoimmune destruction of beta cells even after disease manifestation.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the skilful technical assistance of S. Eghtessadi, D. Lischke and U. Sommerfeld. T.A. was a graduate student in the Graduate Research Training Programme No. 705-2 funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. This work has been supported by the NIH grant 1R21AI55464-01, a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (JO 395/1-3) and the European Union (STREP SaveBeta LSHM-CT-2006-036903).

References

1. Lenzen S, Tiedge M, Elsner M, Lortz S, Weiss H, Jörns A, Klöppel G, Wedekind D, Prokop CM, Hedrich HJ: The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:1189-1196, 2001
2. Ellerman KE, Like AA: Susceptibility to diabetes is widely distributed in normal class IIu haplotype rats. *Diabetologia* 43:890-898, 2000
3. Wedekind D, Weiss H, Jörns A, Lenzen S, Tiedge M, Hedrich HJ: Effects of polyinosinic-polycytidylic acid and adoptive transfer of immune cells in the Lew.1AR1-iddm rat and in its coisogenic LEW.1AR1 background strain. *Autoimmunity* 38:265-275, 2005
4. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH: Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 42:44-55, 1993
5. Logothetopoulos J, Valiquette N, MacGregor D, Hsia T: Adoptive transfer of insulinitis and diabetes in neonates of diabetes-prone and -resistant rats. Tissue localization of injected blasts. *Diabetes* 36:1116-1123, 1987
6. McKeever U, Mordes JP, Greiner DL, Appel MC, Rozing J, Handler ES, Rossini AA: Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7618-7622, 1990
7. Metroz-Dayer MD, Mouland A, Brideau C, Duhamel D, Poussier P: Adoptive transfer of diabetes in BB rats induced by CD4 T lymphocytes. *Diabetes* 39:928-932, 1990
8. Whalen BJ, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA: Adoptive transfer of autoimmune diabetes mellitus to athymic rats: synergy of CD4+ and CD8+ T cells and prevention by RT6+ T cells. *J Autoimmun* 7:819-831, 1994
9. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y: Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35:855-860, 1986
10. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC: TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* 115:2904-2913, 2005
11. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A: High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238, 1990
12. Jörns A, Rath KJ, Bock O, Lenzen S: Beta cell death in hyperglycaemic Psammomys obesus is not cytokine-mediated. *Diabetologia* 49:2704-2712, 2006
13. Jörns A, Günther A, Hedrich HJ, Wedekind D, Tiedge M, Lenzen S: Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes* 54:2041-2052, 2005
14. Rolstad B, Fossum S: Non-adaptive cellular immune responses as studied in euthymic and athymic nude rats. Spontaneous rejection of allogeneic lymphoid cell grafts by natural killer (NK) cells. *Anat Embryol (Berl)* 181:215-226, 1990
15. Bisikirska BC, Herold KC: Regulatory T cells and type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 5:104-109, 2005
16. James EA, Kwok WW: CD8+ suppressor-mediated regulation of human CD4+ T cell responses to glutamic acid decarboxylase 65. *Eur J Immunol* 37:78-86, 2007

17. Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO: Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18425-18430, 2005
18. Holm BC, Svensson J, Akesson C, Arvastsson J, Ljungberg J, Lynch K, Ivarsson SA, Lernmark A, Cilio CM: Evidence for immunological priming and increased frequency of CD4+ CD25+ cord blood T cells in children born to mothers with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 146:493-502, 2006
19. Sempe P, Ezine S, Marvel J, Bedossa P, Richard MF, Bach JF, Boitard C: Role of CD4+CD45RA+ T cells in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Int Immunol* 5:479-489, 1993
20. Yagi H, Matsumoto M, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M: Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol* 22:2387-2393, 1992
21. Han G, Shao H, Peng Y, Zhang P, Ke Y, Kaplan HJ, Sun D: Suppressor role of rat CD8+CD45RClow T cells in experimental autoimmune uveitis (EAU). *J Neuroimmunol* 183:81-88, 2007
22. Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I, Druet P, Liblau R, Gonzalez-Dunia D, Saoudi A: Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104:3294-3301, 2004
23. Jiang H, Zhang SI, Pernis B: Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256:1213-1215, 1992
24. Edouard P, Hiserodt JC, Plamondon C, Poussier P: CD8+ T-cells are required for adoptive transfer of the BB rat diabetic syndrome. *Diabetes* 42:390-397, 1993
25. Carlsen M, Cilio CM: Evidence for De Novo Expression of Thymic Insulin by Peripheral Bone Marrow-derived Cells. *Scand J Immunol*, 2008
26. Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C: Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol* 19:1947-1951, 1989
27. Miller BJ, Appel MC, O'Neil JJ, Wicker LS: Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 140:52-58, 1988
28. Nagata M, Yoon JW: Studies on autoimmunity for T-cell-mediated beta-cell destruction. Distinct difference in beta-cell destruction between CD4+ and CD8+ T-cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. *Diabetes* 41:998-1008, 1992
29. Shimizu J, Kanagawa O, Unanue ER: Presentation of beta-cell antigens to CD4+ and CD8+ T cells of non-obese diabetic mice. *J Immunol* 151:1723-1730, 1993
30. Lundsgaard D, Holm TL, Hornum L, Markholst H: In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4+CD25+ T-cells expressing Foxp3. *Diabetes* 54:1040-1047, 2005
31. Stephens LA, Mason D: CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol* 165:3105-3110, 2000

32. Zipris D, Hillebrands JL, Welsh RM, Rozing J, Xie JX, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA: Infections that induce autoimmune diabetes in BBDR rats modulate CD4+CD25+ T cell populations. *J Immunol* 170:3592-3602, 2003
33. You S, Sleehoffer G, Barriot S, Bach JF, Chatenoud L: Unique role of CD4+CD62L+ regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes in T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14580-14585, 2004
34. Hillebrands JL, Whalen B, Visser JT, Koning J, Bishop KD, Leif J, Rozing J, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA: A regulatory CD4+ T cell subset in the BB rat model of autoimmune diabetes expresses neither CD25 nor Foxp3. *J Immunol* 177:7820-7832, 2006
35. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W: Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34:623-630, 2004
36. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886, 2003
37. Greiner DL, Mordes JP, Handler ES, Angelillo M, Nakamura N, Rossini AA: Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. *J Exp Med* 166:461-475, 1987
38. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Adorini L: Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J Immunol* 171:4040-4047, 2003
39. Peng J, Dicker B, Du W, Tang F, Nguyen P, Geiger T, Wong FS, Wen L: Converting antigen-specific diabetogenic CD4 and CD8 T cells to TGF-beta producing non-pathogenic regulatory cells following FoxP3 transduction. *J Autoimmun* 28:188-200, 2007
40. Jiang H, Kashleva H, Xu LX, Forman J, Flaherty L, Pernis B, Braunstein NS, Chess L: T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4533-4537, 1998
41. Roep BO: Islet autoreactive CD8 T-cells in type 1 diabetes: licensed to kill? *Diabetes* 57:1156, 2008
42. Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel E, Khazaie K, von Boehmer H: Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 212:163-169, 2006
43. Jaeckel E, Mpofo N, Saal N, Manns MP: Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 40:126-136, 2008
44. Jaeckel E, Kretschmer K, Apostolou I, von Boehmer H: Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin Immunol* 18:89-92, 2006
45. Pickup JC WG: Textbook of diabetes. Blackwell Scientific Publications, 2004
46. Weiss H, Bleich A, Hedrich HJ, Kolsch B, Elsner M, Jorns A, Lenzen S, Tiedge M, Wedekind D: Genetic analysis of the LEW.1AR1-iddm rat: an animal model for spontaneous diabetes mellitus. *Mamm Genome* 16:432-441, 2005.

Tables

Table 1. Affects of T-cells on induction of diabetes and age of manifestation after selective transfer from diabetic LEW.1AR1- *iddm* rats into LEW.1AR1-*Whn^{mmu}* recipients.

Transferred Lymphocytes	Number of animals	Diabetic incidence	Age of manifestation (days)	Time until manifestation (Δ days)	Insulitis Score
None (control)	18	0/18	-	-	0
Pan T-cells (3)	14	14/14 [#] (100 %)	127 \pm 11	44 \pm 5	3.1 \pm 0.2
CD4 ⁺	17	10/21 (50 %)	111 \pm 2	72 \pm 10 [†]	2.2 \pm 0.3*
CD8 ⁺	14	0/14	-	-	0
CD4 ⁺ and CD8 ⁺	10	1/10 [¶] (10 %)	164	78	3.0

Diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats were used as donors. These rats were derived from a colony with a diabetes incidence of 60 %. All LEW.1AR1-*Whn^{mmu}* recipients were diabetes-resistant. The age of all LEW.1AR1-*iddm* donor rats was between 55 and 65 days, while the age of all LEW.1AR1-*Whn^{mmu}* recipients was between 33 and 85 days. The different T-cells were injected i.v. into athymic LEW.1AR1-*Whn^{mmu}* recipients as described at Research Design and Methods. Islet infiltration was graded on a score of 0 – 4. A mean insulitis score was calculated from 10 – 15 islets analysed per pancreas. Age of manifestation, time until manifestation and insulitis scores are shown as mean values \pm S.E.. *p < 0.05 compared with pan T-cells, [†]p < 0.05 compared with Pan T-cells (ANOVA plus Bonferroni post test); #p < 0.05 compared with control; [¶]p < 0.05 compared with transfer of pan T-cells and CD4⁺ T-cells (χ^2 test).

Table 2. Effects of T-cells on induction of diabetes and age of manifestation after selective transfer from (a) diabetes-resistant LEW.1AR1 rats into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* recipients, (b) diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* recipients.

Transferred Lymphocytes	Number of animals	Diabetic incidence	Age of manifestation (days)	Time until manifestation (Δ days)	Insulinitis Score
None (Control)	40	24/40 (60 %)	63 \pm 1	n.d.	3.5 \pm 0.3
(a) Donor: LEW.1AR1					
Pan T-cells (3)	23	7/23 [#] (30 %)	65 \pm 4	38 \pm 5	1.7 \pm 0.3*
CD4 ⁺	20	11/20 (55 %)	62 \pm 2	27 \pm 8	2.3 \pm 0.2*
CD8 ⁺	21	8/21 [#] (38 %)	64 \pm 3	35 \pm 3	3.3 \pm 0.4
CD4 ⁺ and CD8 ⁺	19	10/19 (53 %)	54 \pm 2	24 \pm 2	3.4 \pm 1.2
(b) Donor: LEW.1AR1- <i>iddm</i> , diabetic					
CD4 ⁺	5	3/5 (60 %)	65 \pm 1	34 \pm 1	3.7 \pm 0.3
CD8 ⁺	10	2/10 (20 %)	77 \pm 7	46 \pm 7	3.5 \pm 0.5

Prediabetic (day 30) LEW.1AR1-*iddm* rats were used as recipients. LEW.1AR1 donor rats (a) (age > 60 days) did not develop spontaneous diabetes. Diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats used as donors (b), were derived from a colony with a diabetes incidence of 60 %. The different T-cells were injected i.v. into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* recipients as described in Research Design and Methods. Islet infiltration was graded on a score of 0 – 4. 0 The insulinitis score were defined 0 - no infiltration, 1 - infiltration restricted to the periphery of the islets, 2 - weak infiltration of the whole islet, 3 - severe infiltration of the whole islet, 4 - end stage islet with few residual beta cells (13). A mean insulinitis score was calculated from 10 – 15 islets analysed per pancreas. Age of manifestation, time until manifestation and insulinitis scores are shown as mean values \pm S.E. *p < 0.05 compared with LEW.1AR1-*iddm* control (ANOVA plus Bonferroni post test); #p < 0.05 compared with control rats (χ^2 test).

Table 3. Relative expression of CD25, FoxP3 and CD134 of pan T-cells from diabetic LEW.1AR1- *iddm* rats or LEW.1AR1 rats before and after ConA stimulation.

Relative expression of the gene encoding	Before ConA stimulation	After ConA stimulation
CD25 of pan T-cells from LEW.1AR1- <i>iddm</i>	0.009 ± 0.001	0.417 ± 0.070 *
CD25 of pan T-cells from LEW.1AR1	0.014 ± 0.047	1.008 ± 0.166 **
FoxP3 of pan T-cells from LEW.1AR1- <i>iddm</i>	0.028 ± 0.006	0.211 ± 0.034 *
FoxP3 of pan T-cells from LEW.1AR1	0.135 ± 0.036	0.207 ± 0.040
CD134 of pan T-cells from LEW.1AR1- <i>iddm</i>	0.076 ± 0.041	0.334 ± 0.077
CD134 of pan T-cells from LEW.1AR1	0.092 ± 0.06	0.568 ± 0.101

Immune cells were isolated from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats and LEW.1AR1 rats. RT-PCR was performed for CD25, FoxP3, and CD134. The normalized expression to the housekeeping gene β -actin is shown as mean values \pm S.E.. * $p < 0.05$ compared before and after ConA stimulation.

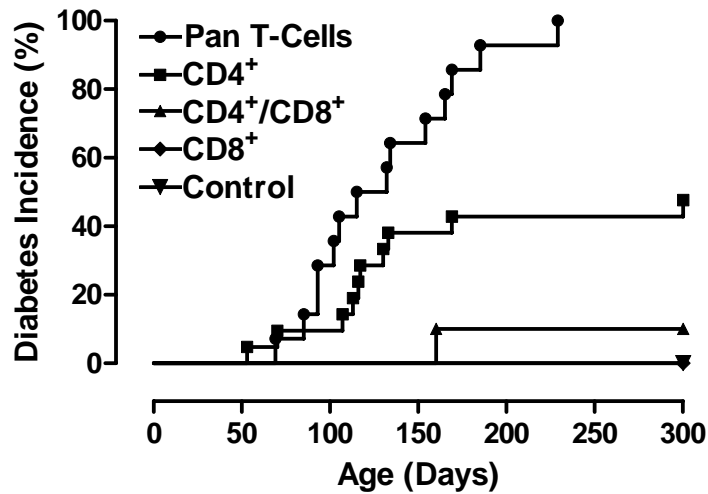


Fig. 1. Diabetes manifestation after selective transfer of T-cell subpopulations from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into LEW.1AR1-*Whntm* rats. The LEW.1AR1-*Whntm* strain did not develop spontaneous diabetes. The age of the donor rats was between 55 and 65 days, while the age of all recipients was between 33 and 85 days. The T-cells were injected i.v. into athymic LEW.1AR1-*Whntm* recipients as described at Research Design and Methods. After transfer of T-cells blood glucose of recipients was monitored two times a week. Data were calculated by Maier-Kaplan analyses.

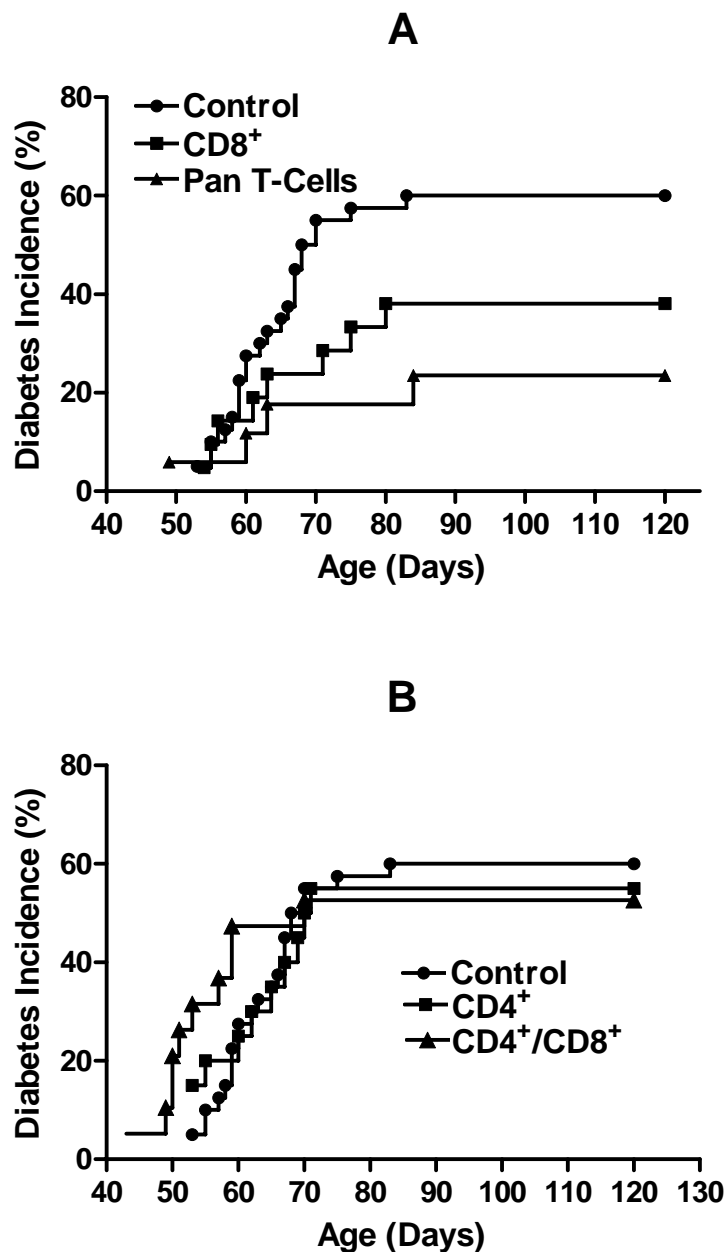


Fig. 2 Diabetes manifestation after selective transfer of Pan T-cells, CD8⁺ (A), CD4⁺ or a combination of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (B) from LEW.1AR1 rats into LEW.1AR1-*iddm* rats. Prediabetic (day 30) LEW.1AR1-*iddm* rats were used as recipients. LEW.1AR1 donor rats (age > 60 days) did not develop spontaneous diabetes. The T-cells were injected i.v. into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* recipients as described at Research Design and Methods. After transfer of T-cells blood glucose of recipients was monitored two times a week. Data were calculated by Maier-Kaplan analyses.

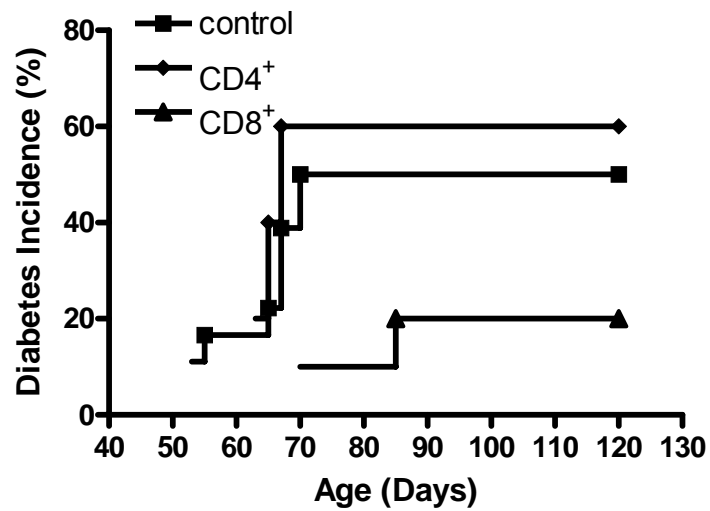


Fig. 3. Diabetes manifestation after selective transfer of CD8⁺ or CD4⁺ from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. Prediabetic (day 30) LEW.1AR1-*iddm* rats were used as recipients. All diabetic LEW.1AR1-*iddm* donor rats was between 33 and 85 days. The T-cells were injected i.v. into prediabetic LEW.1AR1-*iddm* recipients as described at Research Design and Methods. After transfer of T-cells blood glucose of recipients was monitored two times a week. Data were calculated by Maier-Kaplan analyses.

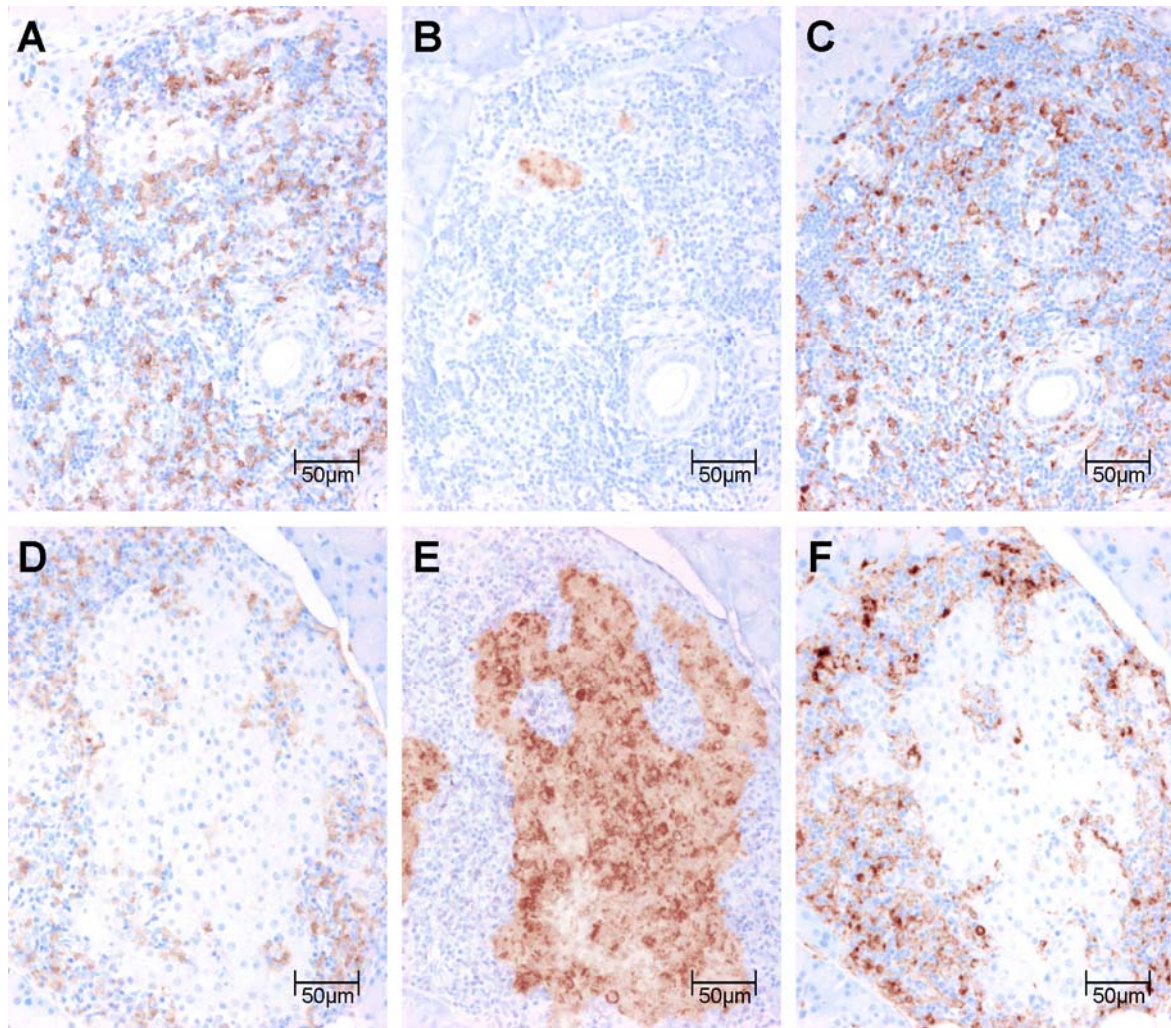


Fig. 4. Infiltrated pancreatic islets from LEW.1AR1-*iddm* and LEW.1AR1-*Whn^{m/m}* recipients after transfer of CD4⁺ T-cells. LEW.1AR1-*iddm* rats (A-C) received CD4⁺ T-cells from the diabetes-resistant LEW.1AR1 rats. LEW.1AR1-*Whn^{m/m}* rats (D-F) received CD4⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. Sections were immunostained for cytotoxic CD8⁺ T-cells (A, D), insulin (B, E), and ED1 infiltrating macrophages (C, F). Notably, infiltrating CD8⁺ T-cells in LEW.1AR1-*Whn^{m/m}* rats showed only a very faint staining for this antigen as typical sign for the immunodeficient status (D). Magnification x 400.

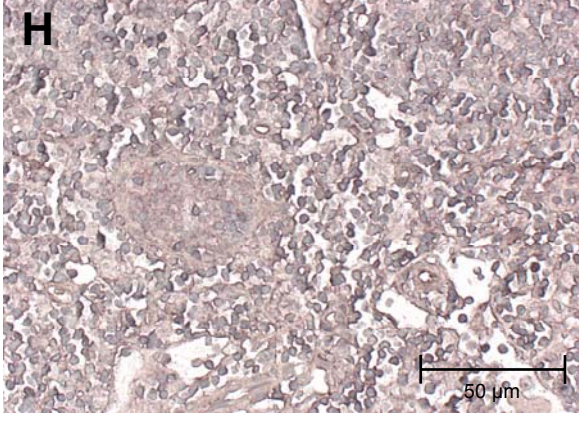
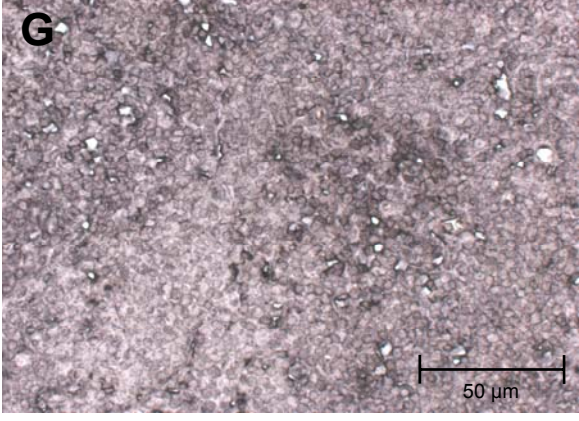
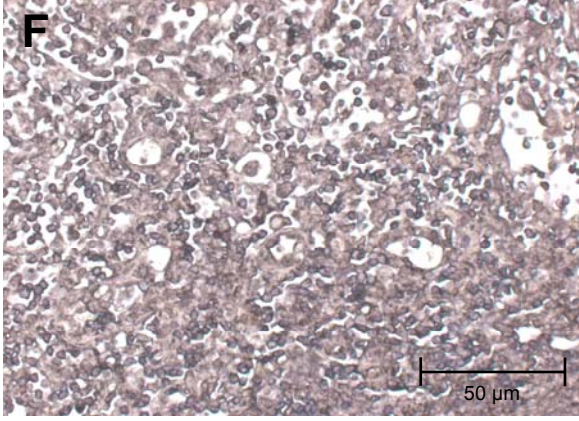
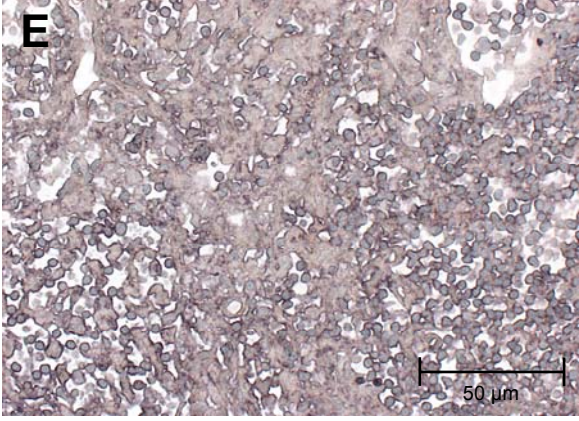
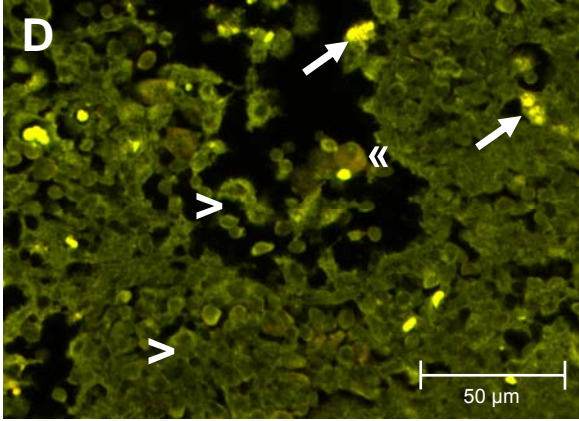
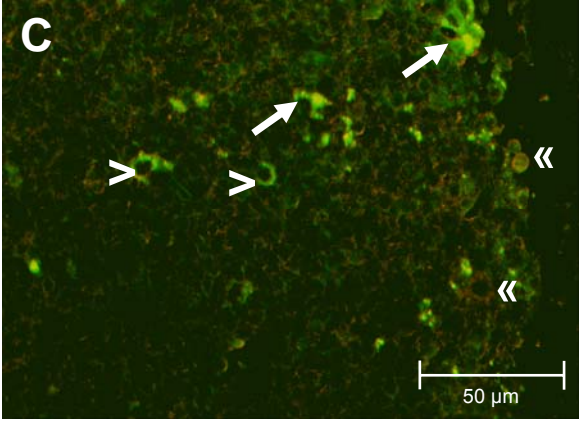
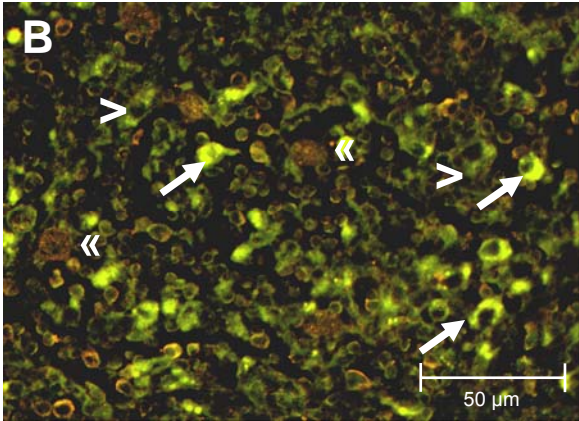
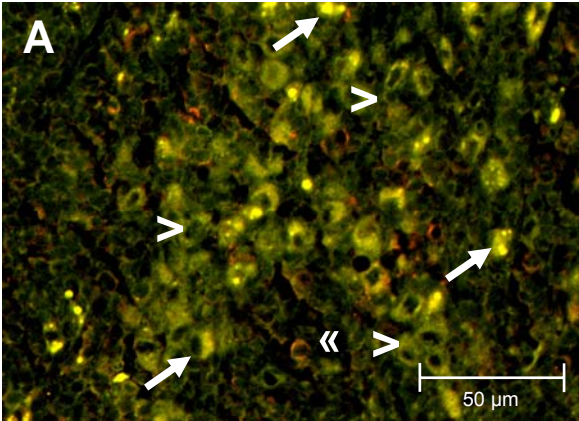


Fig. 5. Regulatory T-cell subpopulations and cytokine expression in pancreas draining lymph nodes of LEW.1AR1-*iddm* rats after transfer of CD8⁺ or CD4⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats.

LEW.1AR1-*iddm* rats (A-H) received either CD8⁺ T-cells (A, B, E, F) or CD4⁺ T-cells (C, D, G, H) from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. Sections were immunostained for CD8⁺ T-cells (A, C), CD4⁺ T-cells (B, D), and: CD25 (Il-2R) (A-D) to identify the regulatory T-cell subpopulation in the CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. CD4⁺/CD25⁺ (A, C) and CD8⁺/CD25⁺ (B, D) cells were identified in the overlay modus. CD4⁺/CD25⁺ T-cells are marked by *arrows* (*yellow*), CD4⁺ T-cells or CD8⁺ T-cells alone by *arrowheads* (*green*, Cy2) and cells expressing only CD25 by *double arrowheads* (*red*, Cy3). Gene expression analyses of the proinflammatory cytokine TNF- α (E, F) and the anti-inflammatory cytokine IL-4 (G, H) were performed by *in situ* RT-PCR with the colour reaction of nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt in pancreas draining lymph nodes. After CD8⁺ T-cell transfer the mRNA transcripts of TNF- α were reduced in the immune cells whereas the IL-4 mRNA expression increased in the immune cells leading to a conversion of pro- and anti-inflammatory cytokine situation under diabetic conditions after CD4⁺ T-cell transfer. Magnification (A-D) x 800, (E-H) x 400.

Supplementary Data

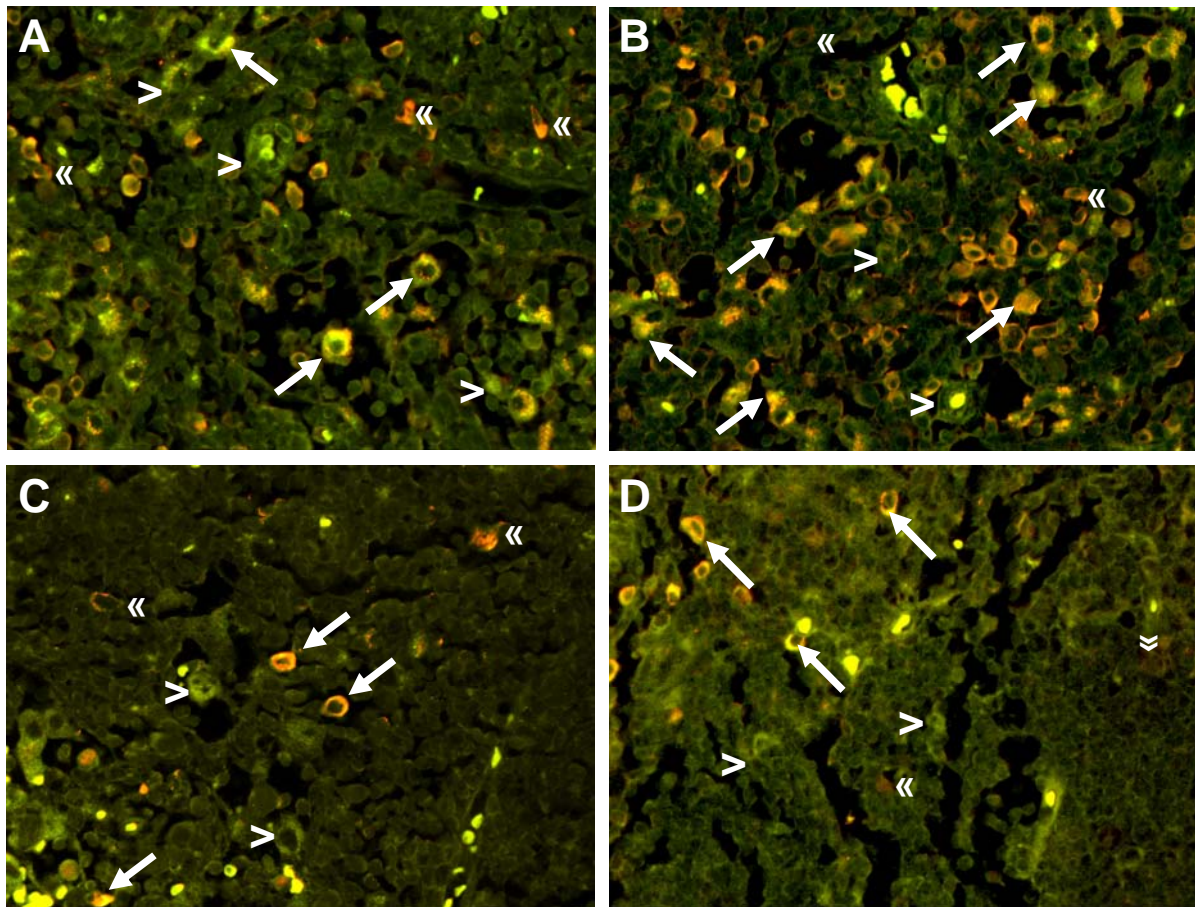


Fig. S1. Regulatory T-cell subpopulations in pancreas draining lymph nodes of LEW.1AR1-*iddm* rats after transfer of CD8⁺ T-cells in comparison to transfer of CD4⁺ T-cells from diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats. LEW.1AR1-*iddm* rats (A-D) received either CD8⁺ T-cells from the diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats to protect diabetes manifestation (A, B) or CD4⁺ T-cells from the diabetic LEW.1AR1-*iddm* rats to induce diabetes (C, D). Sections were immunostained for CD8⁺ T-cells (A, C), CD4⁺ T-cells (B, D), and FoxP3 (A-D) to identify the regulatory T-cell subpopulation in the CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. After CD8⁺ T-cell transfer both T-cell subpopulations of CD4⁺/FoxP3⁺ (A, C), CD8⁺/FoxP3⁺ (B, D) identified in the overlay modus increased indicating the high amount of regulatory T-cell subpopulations inside the pancreas draining lymph node in the non-diabetic protective situation. In contrast after the CD4⁺ T-cell transfer only occasionally CD4⁺ or CD8⁺ T-cells expressed also the FoxP3 showing a lower number of regulatory T-cells in the pancreas draining lymph node in the diabetic situation. CD4⁺ T-cells expressing also FoxP3 are marked by *arrows* (yellow-orange), CD4⁺ T-cells or CD8⁺ T-cells alone by *arrowheads* (green, Cy2) and cells expressing only FoxP3 by *double arrowheads* (red, Cy3).

3. Diskussion

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer vollständigen Zerstörung der β -Zellen des Pankreas kommt. Die Folge dieser Zerstörung erfordert eine lebenslange Substitution von Insulin und bedeutet ein hohes Risiko für die Entstehung von vaskulären Spätschäden, welche die Lebensqualität und –erwartung der Erkrankten deutlich reduziert.

Die immunologischen Mechanismen der zellvermittelten Autoimmunität lassen sich am Patienten nur unzureichend untersuchen, da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits mehr als 90 % der β -Zellmasse zerstört ist. Hierdurch erklärt sich der hohe Stellenwert von Tiermodellen des T1DM für die Aufklärung der Pathomechanismen der Autoimmunzerstörung und der Beurteilung der genetischen Prädisposition. Neben den bereits etablierten Nagermodellen wie der BB Ratte, der KDP Ratte und der NOD Maus stellt die LEW.1AR1-*iddm* Ratte ein zusätzliches Tiermodell für den humanen T1DM dar, welches neue Einblicke in die Pathomechanismen der Diabetesmanifestation ermöglichen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die LEW.1AR1-*iddm* Ratte auf genetische und immunologische Aspekte hin untersucht. Die erzielten Ergebnisse wurden auch im Vergleich zum T1DM bei anderen Tiermodellen und beim Menschen bewertet.

3.1. Die Genetik des Typ 1 Diabetes mellitus

Der T1DM ist eine multifaktorielle Erkrankung mit polygenetischem Hintergrund (Pickup & Williams 2003). Seit Beginn der genetischen Analyse dieser Erkrankung sind im Genom von Mensch, Ratte und Maus zahlreiche prädisponierende Loci kartiert worden. Für die 24 beschriebenen *IDDM* Loci des Menschen konnten bisher nur fünf Kandidatengene identifiziert werden, bei denen sich eine unmittelbare Beteiligung an der Pathogenese des T1DM vermuten lässt. Die NOD Maus gehört zu den am besten untersuchten Tiermodellen des spontanen T1DM. Bisher sind 28 suszeptibilitätsvermittelnde Bereiche im Genom der NOD Maus gefunden worden, wobei für acht Bereiche Kandidatengene diskutiert werden. In der Ratte wurden bislang mit Hilfe der T1DM Ratten-Modelle BB und KDP zehn Diabetessuszeptibilitätsregionen identifiziert, die tabellarisch im Anhang aufgeführt sind (s. Tab. A1–A3). In der LEW.1AR1-*iddm* Ratte konnten mit Hilfe einer BN Rückkreuzungspopulation [(BNxLEW.1AR1-*iddm*)xLEW.1AR1-*iddm*] auf Chromosom 1 zusätzlich die Loci *Iddm8* und *Iddm9* identifiziert werden (Weiss *et al.* 2005), die im Gegensatz zu den bekannten *Iddm*-Loci der Ratte und den *Idd*-Loci der Maus Homologien zu beschriebenen *IDDM*-Loci des Menschen aufweisen. Der *Iddm8* Locus (RNO1q51-55) zeigt

einen homologen Bereich im Genom des Menschen zu *IDDM17* (HSA10q25) (Verge *et al.* 1998). Für *Iddm9* (RNO1p11) zeigen sich in der homologen Region des Menschen im telomeren Bereich auf HSA6 zwei *IDDM* Gene (*IDDM5* und *IDDM8*) (Luo *et al.* 1995; Davies *et al.* 1996; Luo *et al.* 1996). Die einzige bekannte genetische Komponente, die gleichermaßen bei Mensch, Maus und Ratte an der Pathogenese des T1DM beteiligt ist, stellt der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) dar, der als *IDDM1/Idd1/Iddm1* beschrieben wird.

Rattenstamm	Suszeptibilitätsregion (RNO)	Gen / Kandidatengen
LEW.1AR1- <i>iddm</i> ; BB; KDP	<i>Iddm1</i> (RNO20p12) (ursprünglich als <i>Iddm2</i> bezeichnet)	RT1-B ^u /D ^u
	<i>Iddm2 – Lyp</i> (RNO4 q24)	<i>Ian5 / Ian4l1</i> (Hornum <i>et al.</i> 2002; MacMurray <i>et al.</i> 2002)
	<i>Iddm3</i> (RNO18 q12.1-13) <i>Iddm3r</i> (RNO2q34-44)	<i>Olf</i>
BB Ratte	<i>Iddm4 – Iddm11</i> (RNO6q32)	
	<i>Iddm4</i> (RNO4q22)	<i>Npy</i>
	<i>Iddm5</i> (RNO13p13)	
	<i>Iddm5r</i> (RNO1q54-55)	<i>Igf2</i>
	<i>Iddm6</i> (RNO3q42)	
LEW.1AR1- <i>iddm</i>	<i>Iddm8</i> (RNO1q51-55)	<i>Nkx2-3; Ins1; Casp7</i>
	<i>Iddm9</i> (RNO1p11-q11)	<i>Sod2</i> ;
KDP Ratte	<i>Iddm / Kdp1</i> (RNO11q21)	<i>Cblb</i> (Yokoi <i>et al.</i> 2002)

Tab. 2 Diabetessuszeptibilitätsregionen, identifizierte Mutationen (Gene) und Kandidatengene der drei Rattenmodelle LEW.1AR1-*iddm*, BB und KDP

Trotz der unterschiedlichen Mutationen findet sich bei der BB Ratte und der KDP Ratte eine Gemeinsamkeit. Beide Mutationen lösen eine generalisierte Autoimmunität aus, die sich zusätzlich zum T1DM in extrapancreatischen, lymphozytären Infiltrationen, z.B. in Schilddrüse, Niere oder Speicheldrüsen zeigt (Kawano *et al.* 1991; Mordes *et al.* 2001). Vor dem genetischen Hintergrund der LEW.1AR1 Ratte führt die Mutation der LEW.1AR1-*iddm* Ratte einzig zu einer fokalen Infiltration der insulinproduzierenden β -Zellen, während andere

Gewebe nicht betroffen sind (Jörns *et al.* 2004). Im Folgenden werden die beiden bereits identifizierten *Iddm* Loci der LEW.1AR1-*iddm* Ratte als mögliche Orte der Mutation diskutiert.

3.1.1. Die genetische Analyse einer zweiten Rückkreuzungspopulation deutet auf eine Lokalisation der Mutation im Diabetessuszeptibilitätslocus *Iddm8* hin.

In dem Tiermodell LEW.1AR1-*iddm* folgt die Suszeptibilität für den T1DM einem autosomal rezessiven Erbgang mit einer unvollständigen Penetranz. Dies führt zu der Frage, ob es möglich ist, die Mutation, welche für die Erkrankung verantwortlich ist, mit einem bestimmten Suszeptibilitätsbereich in Verbindung zu bringen. Eine genomweite Kopplungsanalyse mit einer BN Rückkreuzungspopulation (N2) zeigte drei Suszeptibilitätsbereiche, zwei auf Chromosom 1 (RNO1) im zentromeren (*Iddm9*) und telomeren Bereich (*Iddm8*) und auf Chromosom 20 (RNO20) im Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, *Iddm1*), welche mit der Erkrankung assoziiert werden konnten (Weiss *et al.* 2005). Um den Bereich einzuengen, in dem sich das mutierte Gen befindet, wurde eine weitere Rückkreuzungspopulation mit der PAR Ratte erstellt. Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse wurden mit denen der BN Rückkreuzungspopulation (N2) verglichen. Der PAR Stamm ist ein Ratteninzuchtstamm, der sich genetisch jedoch deutlich von dem LEW Stamm und insbesondere vom BN Stamm unterscheidet (Canzian 1997). Deshalb ist der PAR Stamm geeignet, den Einfluss eines anderen genetischen Hintergrundes auf die Pathogenese des T1DM zu untersuchen. Mithilfe einer Kopplungsanalyse unter Einsatz von Mikrosatellitenmarkern können weitere Suszeptibilitätsregionen gefunden und bereits bekannte bestätigt werden. Die PAR Rückkreuzungspopulation (N2) weist eine Diabetesinzidenz von 16 % auf, welche ebenso mit einer β -Zell-Zerstörung einhergeht wie bei den LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Dieser Befund deutet aufgrund der eingeschränkten Penetranz auf zwei bis drei Suszeptibilitätsloci hin (Weiss *et al.* 2005). Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der Kopplungsanalyse, welche einen Diabetessuszeptibilitätsbereich auf RNO20 innerhalb der MHC Region (*Iddm1*) sowie in der telomeren Region auf RNO1 (*Iddm8*) zeigt.

Die *Iddm9* Region auf RNO1 in der Nähe des Zentromers konnte im Gegensatz zu der BN Rückkreuzungspopulation (N2) bei der PAR Rückkreuzungspopulation (N2) nicht identifiziert werden, da der PAR Stamm und der LEW Stamm in diesem Bereich genetisch identisch sind. Die Mutation der LEW.1AR1-*iddm* Ratte kartiert daher wahrscheinlich im *Iddm8* Locus, weil *Iddm9* auch im genetischen Hintergrund der PAR Ratte vorliegt und der *RT1.B/D^u* Haplotyp ein T1DM Suszeptibilitätslocus ist.

Eine Analyse von *Iddm8* der diabetischen BN Rückkreuzungspopulation (N2) zeigte, dass alle diabetischen Tiere homozygot für die Marker *DIZtm17* und *DIZtm19* waren. Auch in der diabetischen PAR Rückkreuzungspopulation (N2) waren 90 % der Tiere homozygot für *DIZtm17*, *DIZtm18* und *DIZtm19*. Im Vergleich zu *Iddm1*, der eine Heterozygotie von 15 – 20 % in beiden Rückkreuzungspopulationen zeigt, kann somit ausgeschlossen werden, dass die Mutation, die für die autosomal rezessive Vererbung verantwortlich ist, innerhalb des dieses Locus liegt.

Mithilfe der BN Rückkreuzungspopulation (N2) konnte der *Iddm8* Locus innerhalb der BN Rückkreuzungspopulation (N2) in dem Bereich 1q51-55 kartiert werden, beginnend mit dem Marker *DIRat496* (243.2 Mb) (Weiss *et al.* 2005). Sowohl 1q43 als auch 1q51 grenzen an das telomere Ende von RNO1. Die Suszeptibilitätsregion konnte innerhalb der PAR Rückkreuzungspopulation (N2) eindeutig begrenzt werden, während die *Iddm8* Region bei der BN Rückkreuzungspopulation (N2) in Richtung des Telomers kein definierbares Ende hat. Die physikalische Position der *Iddm8* Suszeptibilitätsregion auf RNO1 konnte mithilfe der eingesetzten Mikrosatellitenmarker und der bekannten Sequenz von BN/SsNHsdMew Ratten (<http://genome.ucsc.edu/>) ermittelt werden. Die verwendeten Mikrosatellitenmarker kartieren in gleicher Reihenfolge innerhalb der genetischen Karte. Eine Ausnahme bilden nur *DIZtm18*, *DIZtm19* und *DIZtm17*. Diese Marker liegen auf RNO1q43 zwischen 213.13 Mb und 213.19 Mb hinter *DIMgh11* bei 209.1 Mb, und *DIWox22* bei 203.1 Mb, wohingegen die ermittelte genetische Reihenfolge aufgrund der Kopplungsanalyse die folgende ist: *DIZtm17* (120.9 cM), *DIZtm19* (121.0 cM) *DIMgh11* (122.5 cM), *DIZtm18* (122.5 cM) und *DIWox22* (124.7 cM). Dieser Befund kann auf unterschiedliche Rekombinationsereignisse bei Kreuzung genetisch verschiedener Stämme zurückgeführt werden. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass der *Iddm8* Locus (RNO1q51-55), der über eine BN Rückkreuzungspopulation (N2) ermittelt wurde, identisch ist mit dem T1DM Suszeptibilitätslocus, der anhand der PAR Rückkreuzungspopulation (N2) identifiziert wurde (Weiss *et al.* 2005).

Die genomische Region für die Marker innerhalb *Iddm8*, welche in der PAR Rückkreuzungspopulation (N2) gefunden werden konnte, wurde mit Hilfe der Ensembl Datenbank (www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/) analysiert und konnte auf RNO1q43 zwischen 213.13Mb und 213.19Mb kartiert werden. In dieser Region kartieren die als potentielle Kandidaten betrachteten Gene *Cd5* (Gimferrer *et al.* 2003), *Cd6* (Castro *et al.* 2003), *Slc15a3* (Sakata *et al.* 2001), *Hspa5bp1* (Chang *et al.* 2003; Oh-hashii *et al.* 2003) und *Ddb1* (Sun *et al.* 2002). *Cd5* und *Cd6* spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der T-Lymphozyten und können die Autoimmunität beeinflussen. Jedoch zeigte die komplette

Sequenzierung der cDNA für die kodierenden Bereiche von *CD5* und *CD6* keine Unterschiede zwischen diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten und dem Hintergrundstamm LEW.1AR1. Dennoch kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass eine mögliche Mutation in der Promotorregion das Expressionsniveau von *CD5* und *CD6* beeinflusst oder aber die Mutation in den Intron-Bereichen lokalisiert sein könnte. *Slc15a3* kodiert für ein Protein, das eine wichtige Rolle im Proteinkatabolismus im lymphatischen System spielt und somit einen Einfluss auf die Selektion der autoaggressiven T-Zellen hat. *Hspa5bp1* (heat shock 70 kDa protein 5 binding protein-1) kodiert für ein ER/Golgi Protein, welches für eine negative Regulation von hunger-induziertem Zelltod in Gewebekulturen verantwortlich ist. *Ddb1* (damage-specific DNA binding protein-1) ist beteiligt an der Nucleotidentfernung beim DNA Reparaturmechanismus. Interessanterweise haben alle Gene einen Einfluss auf das zelluläre Immunsystem oder sind an Abwehrmechanismen der Zelle beteiligt. Daher bieten diese Daten eine gute Grundlage für eine umfassendere Analyse der Gen- und Proteinexpression dieser Kandidatengene in Immunzellen sowie in β -Zellen des Pankreas in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte während der Diabetesmanifestation.

Die Diabetes-Suszeptibilitätsmarker, welche in den PAR und BN Rückkreuzungspopulationen (N2) ermittelt werden konnten, werden helfen, die Region auf RNO1 einzugrenzen, die sehr wahrscheinlich die Mutation trägt, und welche autosomal rezessiv vererbt wird. Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalysen in den Tieren der PAR Rückkreuzungspopulation (N2) zeigen deutlich, dass die Mutation, die zum autoimmun vermittelten Diabetes in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte führt, im Suszeptibilitätsbereich *Iddm8* innerhalb der telomeren Region auf RNO1 lokalisiert. Die Identifizierung der Mutation wird auch zum Verständnis der Mechanismen beitragen, die zur autoimmunen β -Zellzerstörung im Menschen führen.

3.2. Die Immungenetik des Typ 1 Diabetes mellitus

Neben dem Phänotyp des T1DM konnte ein weiteres Merkmal in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte beobachtet werden. Untersuchungen mit einem Durchflußzytometer unter Einsatz monoklonaler Antikörper zeigten, dass sich das immunologische Milieu im peripheren Blut der LEW.1AR1-*iddm* Ratten unabhängig von der Entwicklung eines T1DM deutlich von dem der koisogenen LEW.1AR1 Ratten unterscheidet. Die LEW.1AR1-*iddm* Ratten zeigten nicht nur im Vergleich zum koisogenen Hintergrundstamm, sondern auch innerhalb der LEW.1AR1-*iddm* Population enorme Variationen im Hinblick auf den prozentualen Anteil an CD3⁺ T-Zellen im peripheren Blut auf. Auch für dieses Merkmal wurde eine

Kopplungsanalyse durchgeführt und die ermittelten Suszeptibilitätsbereiche mit den bereits oben beschriebenen Loci verglichen.

3.2.1. Die genetische Analyse beider Rückkreuzungspopulationen auf den Phänotyp „heterogener T-Zellanteil“ deuten auf eine Lokalisation der Mutation im Diabetessuszeptibilitätslocus *Iddm8* hin.

In der LEW.1AR1-*iddm* Ratte wird die Suszeptibilität für den T1DM autosomal rezessiv vererbt. Da es sich um einen Inzuchtstamm handelt, tragen alle Tiere die Mutation, jedoch kommt es nur in 60 % der Tiere zur Diabetesmanifestation (inkomplette Penetranz). Allerdings zeigen die Tiere nicht nur den Phänotyp des T1DM, sondern es konnte innerhalb der Population auch der Phänotyp eines heterogenen T-Zellgehaltes gefunden werden. In dieser Arbeit wurde das Tiermodell der LEW.1AR1-*iddm* Ratte für den „heterogenen T-Zellanteil“ phänotypisiert. Die folgende Genotypisierung mittels Kopplungsanalysen zeigte, wo die verantwortliche Mutation lokalisiert ist.

3.2.1.1. T-Zellgehalt in peripheren Blut Lymphozyten (PBL) in diabetischen und nicht diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten und in dem Hintergrundstamm LEW.1AR1

Durchflußzytometrische Analysen zeigten signifikante Unterschiede im immunologischen Milieu innerhalb der Lymphozyten im peripheren Blut (PBL) bei der LEW.1AR1-*iddm* Ratte im Vergleich zum koisogenen Hintergrundstamm LEW.1AR1. Die LEW.1AR1-*iddm* Tiere hatten nicht nur einen erniedrigten CD3⁺ T-Zellgehalt im Vergleich zum Hintergrundstamm. Der CD3⁺ T-Zellgehalt lässt auch eine starke Variabilität zwischen 34 % und 80 % innerhalb der gesamten LEW.1AR1-*iddm* Population erkennen. Die diabetischen Tiere zeigten einen signifikant niedrigeren CD3⁺ T-Zellgehalt im Gegensatz zu nicht-diabetischen Tieren. Eine Korrelation zwischen dem T-Zellanteil und Lebensalter konnte nicht festgestellt werden.

Die Veränderungen im CD3⁺ T-Zellgehalt sind wesentlich auf einen reduzierten CD4⁺ T-Zellanteil (30 %) im Vergleich zum Hintergrundstamm (46 %) zurückzuführen. Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen zeigte keine signifikanten Veränderungen. Allerdings zeigten beide T-Zellsubpopulationen, CD4⁺ und CD8⁺, auch wieder starke Variabilitäten im Vergleich zum Hintergrundstamm.

Bislang wird die LEW.1AR1-*iddm* Ratte als immunkompetentes Tiermodell angesehen, weil sie im Gegensatz zu anderen Tiermodellen für den humanen T1DM keine bedeutenden Immundefizienzen zeigt. Die NOD Maus zeigte parallel zur Manifestation des Diabetes

zusätzlich zahlreiche angeborene Defekte des Immunsystems, die eine Verlagerung von potentiell autoreaktiven T-Lymphozyten in die Peripherie und somit auch in die Pankreasinsel fördern (Stratmann *et al.* 2003). Insbesondere ein Defekt der antigenpräsentierenden Zellen wurde für eine funktionsgestörte Toleranzentwicklung verantwortlich gemacht (Serreze 1993; Serreze *et al.* 1993). Darüber hinaus wurden aber auch Funktionsdefekte der T-Lymphozyten gefunden, wobei apoptotische Signalwege in diesen Zellen gestört sind (Kishimoto & Sprent 2001). Die BB Ratte zeigt eine Lymphopenie der peripheren T-Zellen sowie eine Fehlfunktion bei den verbleibenden Zellen (Bellgrau *et al.* 1982), welche obligat ist für die Diabetesmanifestation in diesem Tiermodell (Guttmann *et al.* 1983; Jackson *et al.* 1984; Klötting *et al.* 1995). Eine Mutation des *Lyp* Genlocus ist verantwortlich für den nahezu vollständigen Verlust an peripheren T-Lymphozyten, der in homozygoten Tieren vorliegt (Elder & Maclaren 1983). Dieser Defekt stellt somit einen wesentlichen Unterschied zum humanen T1DM dar (Klötting *et al.* 1997). Bei der KDP Ratte wurde eine Mutation im *Cblb* Gen gefunden (Yokoi *et al.* 1997; Yokoi *et al.* 2002), welche einen Einfluss auf die T-Zellaktivierung hat und somit als Auslöser des T1DM in der KDP Ratte gilt. Eine weitere Information über den Immunstatus dieser Tiere ist nicht verfügbar.

Diese in den Inzuchtstämmen beschriebenen Immundefekte unterschieden sich jedoch stark von denen des Menschen. Verschiedene Studien im diabetischen Patienten haben eine veränderte Verteilung der peripheren T-Zellen gezeigt. Dieses konnte sowohl bei der Diagnose als auch während des Krankheitsverlaufs festgestellt werden (Petersen *et al.* 1996; Roep 2003). Ähnlich wie in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte wurden auch hier Veränderungen in den Lymphozytensubpopulationen beschrieben (Herold *et al.* 1984; Faustman *et al.* 1989; al Sakkaf *et al.* 1992; Kaaba & Al-Harbi 1995; Kimura *et al.* 1998). Allerdings wird kontrovers diskutiert, welche T-Zellsubpopulation erniedrigt oder erhöht ist (Richens & Jones 1985; Pontesilli *et al.* 1986; Legendre *et al.* 1988; Spooren *et al.* 1993; Petersen *et al.* 1996). Daher können beim Menschen verschiedene Veränderungen des Immunsystems, jedoch immer auf der Grundlage einer veränderten T-Zellverteilung, zur Manifestation des T1DM beitragen.

Normalerweise wird die T-Zellzahl streng reguliert, so dass die Größe des peripheren Pools über die Lebensdauer konstant bleibt (Van Parijs & Abbas 1998). Die T-Zellteilung durch „basale Proliferation“ (Goldrath *et al.* 2002) oder „spontane Proliferation“ (Min *et al.* 2004) ist minimal. Im Gegensatz dazu beschreibt die homoeostatische Proliferation oder auch „Lymphopenie-induzierte Proliferation“ (Schuler *et al.* 2004) eine gesteuerte Expansion der T-Zellen. Kritische Signale für diese Art der Expansion sind „Leerraum“, Kontakt mit MHC/Peptid-Komplexen (Prlic *et al.* 2001; Prlic & Jameson 2002) und Zytokinstimulation.

Studien in der NOD Maus konnten zeigen, dass durch diese homoeostatische Proliferation bevorzugt inselzellspezifische T-Zellen generiert werden. Aufgrund einer verkürzten Lebensspanne von T-Zellen, kommt es zu einer immer wiederkehrenden Stimulation der Selbstpeptid/MHC-Komplex spezifischen T-Zellen (Marleau & Sarvetnick 2005).

3.2.1.2. CD4⁺/CD8⁺ Verhältnis in T-Zellen (PBL) in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte und dem Hintergrundstamm LEW.1AR1

Die in der LEW.1AR1-*iddm* Population ermittelten Veränderungen des T-Zellgehaltes haben auch einen direkten Einfluss auf das Verhältnis von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen. Im Vergleich zum Hintergrundstamm LEW.1AR1 ist der Mittelwert des Verhältnisses von CD4⁺/CD8⁺ sowohl in diabetischen als auch in nicht-diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten signifikant reduziert. Diese Reduktion ist eher zurückzuführen auf Veränderungen im CD4⁺ T-Zellgehalt als auf Veränderungen im CD8⁺ Gehalt. Und auch hier ist eine deutlich größere Variabilität innerhalb der LEW.1AR1-*iddm* Population zu erkennen als im Hintergrundstamm. Darüber hinaus ist ein Unterschied zwischen diabetischen und normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten sichtbar.

Das CD4⁺/CD8⁺ T-Zellverhältnis stellt einen wichtigen diagnostischen Marker für die Funktion des Immunsystems dar. Jedoch ist das Verhältnis stammspezifisch. Die LEW.1AR1 Ratte hat eine CD4⁺/CD8⁺ Ratio von 2:1, wohingegen die BB Ratte eine natürliche Ratio von 3:1 hat (Whalen *et al.* 1994). In der NOD Maus liegt sie bei 2,5. Interessanterweise ist ein Anstieg des CD4⁺/CD8⁺ Verhältnisses nur nach Beginn der Insulitis erkennbar, nach der Manifestation des T1DM ist dieses wieder normalisiert, während die absolute Zellzahl jedoch vermindert ist (Zhang *et al.* 1994; Reddy *et al.* 1995).

Auch beim Menschen zeigt ein verändertes T-Zellsubpopulationsverhältnis eine intensive Immunantwort an, wie zum Beispiel bei GvH (*graft vs host disease*) oder bei einer HIV Infektion (Pedersen *et al.* 1990). Bei diabetischen Patienten ist ebenfalls eine veränderte CD4⁺/CD8⁺ Ratio bekannt. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen ist das CD4⁺/CD8⁺ Verhältnis erniedrigt (Al-Sakkaf *et al.* 1989; Faustman *et al.* 1989; Lapolla *et al.* 2005), was mit den hier vorgestellten Ergebnissen übereinstimmt. Auch im Menschen ist offenbar eine Reduktion im CD4⁺ T-Zellanteil für eine Senkung des Verhältnisses verantwortlich und spielt eine wichtige Rolle bei der T1DM Entwicklung. Diese Ergebnisse werden auch kontrovers diskutiert, weil andere Studien bei diabetischen Patienten ein erhöhtes CD4⁺/CD8⁺ Verhältnis beschreiben, welche auf eine Reduktion der CD8⁺ T-Zellsubpopulation zurückzuführen ist. Der Grund für dieses Ungleichgewicht ist noch unbekannt.

3.2.1.3. Vererblichkeit der Variabilität des T-Zellgehalts

Eine Studie an Zwillingen zeigte, dass das CD4⁺/CD8⁺ Verhältnis vererblich ist (Evans *et al.* 1999). Andere Studien geben an, dass die jeweilige vorgefundene Veränderung im T-Zellgehalt auch in nicht-diabetischen Verwandten zu finden ist (Peakman *et al.* 1994; Kaaba & Al-Harbi 1995). Ergänzend dazu gibt es weitere Studien sowohl in Mäusen (Kraal *et al.* 1983) als auch im Menschen (Amadori *et al.* 1995), welche darauf hindeuten, dass das Merkmal des veränderten T-Zellanteils von einem bestimmten Gen beeinflusst wird. Ein Suszeptibilitätsbereich für die CD4⁺/CD8⁺ Ratio konnte im Menschen auf Chromosom 11p kartiert werden (Evans *et al.* 2004). Diese Region ist interessanterweise homolog zu RNO1 und RNO3. Es ist daher nicht auszuschließen, dass in der Ratte das gleiche Gen für die Veränderungen im T-Zellgehalt wie im Menschen verantwortlich ist.

3.2.1.4. Genotypisierung des heterogenen T-Zellgehalts

Mittels Kopplungsanalysen unter Einsatz von Mikrosatellitenmarkern konnte der *Iddm8* Locus innerhalb der telomeren Region von RNO1 sowohl in der BN als auch in der PAR Rückkreuzungspopulation (N2) als Suszeptibilitätsbereich identifiziert werden.

Die ermittelten Daten zeigen, dass die Suszeptibilitätsregion die Mutation trägt, welche nicht nur zum T1DM führt, sondern auch zu einem heterogenen T-Zellanteil innerhalb der gesamten LEW.1AR1-*iddm* Population. Aufgrund des Fehlens weiterer polymorpher Mikrosatellitenmarker war es zunächst nicht möglich, die *Iddm8* Region weiter einzugrenzen. Erst im letzten Jahr wurden zahlreiche SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) zwischen den verschiedenen Rattenstämmen identifiziert (Nijman *et al.* 2008). Mit Hilfe dieser SNPs war es nun möglich, in der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von E. Cuppen in Utrecht den Bereich *Iddm8* von 40 Mb auf 4 Mb einzugrenzen. Dieser weiter eingegrenzte Bereich entspricht RNO1q51. Er enthält Gene wie *Hmgb1* (*High-mobility group box 1*), *Gda* (*Guanin deaminase*) oder *Anxa1* (*annexin A1*), die interessante Kandidaten für die Diabetesmanifestation darstellen.

Hmgb1 wurde ursprünglich als DNA-Bindungsprotein identifiziert, welches als Co-Faktor für die korrekte Regulation der Transkription wirkt. Extrazelluläres Hmgb1 wirkt als pro-inflammatorisches Zytokin, das an der Pathogenese von diversen inflammatorischen sowie Infektionskrankheiten beteiligt ist (Ulloa & Messmer 2006). Neueste Studien an NOD Mäusen zeigen, dass extrazelluläres Hmgb1 als starker Immunmediator wirkt, der an der Progression der Insulinitis und der T1DM Manifestation beteiligt ist (Han *et al.* 2008). Jedoch kartieren in diesem Bereich weitere Gene mit noch unbekannter Funktion.

Die noch ausstehende Identifikation des betroffenen Genes wird letztlich auch zu einem besseren Verständnis der Prozesse führen, die für die Autoimmunzerstörung der β -Zellen in diabetischen Patienten verantwortlich sind, da die LEW.1AR1-*iddm* Ratte ein Tiermodell ist, welches viele Gemeinsamkeiten mit dem humanen T1DM zeigt.

3.3. Die Immunologie des Typ 1 Diabetes mellitus

Der T1DM ist eine T-zellvermittelte Autoimmunkrankheit, bei der die insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas durch Apoptose zerstört werden. Als Ursache dafür werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Eine klassische Methode, um eine zellvermittelte Autoimmungese des T1DM in Tiermodellen nachzuweisen, ist der adoptive Transfer von Immunzellen. In ersten klassischen Transferversuchen (Koevary *et al.* 1983; Like *et al.* 1985) konnte gezeigt werden, dass das autoaggressive Potential der LEW.1AR1-*iddm* Ratte durch Immunzelltransfer übertragbar ist (Wedekind *et al.* 2005). Dadurch konnte das klassische Paradigma einer Autoimmunerkrankung (Bach 1994; Tisch & McDevitt 1996) mit der ursächlichen Beteiligung von Immunzellen für die Ätiologie des Diabetes bestätigt werden. Auf der anderen Seite konnte nach Transfer in den koisogenen Hintergrundstamm kein Diabetes ausgelöst werden. Dieser Schutzmechanismus, der in der LEW.1AR1 Ratte besteht, konnte adoptiv auf den LEW.1AR1-*iddm* Stamm übertragen werden (Wedekind *et al.* 2005). Für das spontan diabetische LEW.1AR1-*iddm* Rattenmodell sollten nun durch selektive Transferversuche insbesondere zwei immunologische Aspekte geklärt werden: (1) welche T-Zellsubpopulation löst eine Induktion des Autoimmunprozesses aus und (2) welche T-Zellsubpopulation in dem koisogenen Hintergrundstamm ist für die Prävention eines Autoimmundiabetes verantwortlich.

3.3.1. Der selektive Transfer ConA stimulierter T-Zellsubpopulationen und dessen Bedeutung bei Induktion oder Prävention des T1DM der LEW.1AR1-*iddm* Ratte

In der durchgeführten Studie sollte das autoaggressive bzw. das regulatorische Potential verschiedener T-Zellsubpopulationen identifiziert werden. Mittels selektiver Transferversuche konnte untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene T-Zellsubpopulationen von diabetischen und nicht-diabetischen Spendertieren auf die Diabetesmanifestation und -inzidenz in athymischen LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* und prädiabetischen LEW.1AR1-*iddm* Empfängertieren hatten.

Es ist bekannt, dass ein Transfer autoaggressiver T-Zellen in BB-DP Ratten und NOD Mäusen eine erhöhte Diabetesinzidenz zur Folge hat (Wicker *et al.* 1986; Logothetopoulos *et*

al. 1987; McKeever *et al.* 1990; Metroz-Dayer *et al.* 1990; Christianson *et al.* 1993; Whalen *et al.* 1994). Im humanen T1DM konnte sowohl autoaggressives als auch regulatorisches Potential innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen identifiziert werden (Bisikirska *et al.* 2005; Bisikirska & Herold 2005; Pinkse *et al.* 2005; James & Kwok 2007). Bei der BB Ratte und der NOD Maus konnte eine regulatorische Funktion nur innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation gefunden werden, wo hingegen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* einen autoaggressiven Charakter besitzen (Yagi *et al.* 1992; Sempe *et al.* 1993). Andererseits konnte jedoch regulatorisches Potential in CD8⁺ T-Zellen in Tiermodellen für die GvH (*graft vs host* Reaktion), bei der Tumorentwicklung und in anderen Autoimmunerkrankungen beobachtet werden (Jiang *et al.* 1992; Xystrakis *et al.* 2004; Han *et al.* 2007). Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass der T1DM aus einem Ungleichgewicht zwischen regulatorischen und autoaggressiven T-Zellen resultiert, ist immer noch unklar, welche T-Zellsubpopulation spezifisch für die Zerstörung oder den Schutz der β -Zellen verantwortlich ist (Yagi *et al.* 1992; Christianson *et al.* 1993; Edouard *et al.* 1993).

3.3.1.1. Transfer unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen induziert oder verhindert die T1DM Entwicklung

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen konnte durch einen adoptiven Transfer von pan T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺ Verhältnis 2:1) aus diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Spendern in allen athymischen LEW.1AR1-*Whn^{mu}* Rezipienten ein Autoimmundiabetes induziert werden (Wedekind *et al.* 2005). Diese Ergebnisse zeigten, dass das autoaggressive Potential der Immunzellen von diabetischen Spendern übertragen werden kann. Ein selektiver Transfer von CD4⁺ T-Zellen alleine oder in Kombination mit CD8⁺ T-Zellen resultiert in einer reduzierten Inzidenz sowie einer späteren Manifestation der Erkrankung bei den athymischen Empfängertieren. Diese Ergebnisse zeigten, dass CD4⁺ T-Zellen den Autoimmunprozess initiieren. Allerdings sind zusätzliche bislang unbekannte Faktoren erforderlich, die einen Anstieg der Diabetesinzidenz auf 100 % in dem immundefizienten Milieu der LEW.1AR1-*Whn^{mu}* Ratte ermöglichen. Der Co-Transfer von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigt, dass innerhalb der CD8⁺ T-Zellsubpopulation von diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Tieren auch regulatorische CD8⁺ T-Zellen enthalten sein müssen, welche dem autoaggressiven Potential der CD4⁺ T-Zellen entgegenwirken. Ebenfalls konnte die Diabetesinzidenz durch den Transfer von CD8⁺ T-Zellen aus dem diabetes-resistenten Hintergrundstamm LEW.1AR1 oder aus diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Spendern signifikant reduziert werden, wodurch die These des regulatorischen Potentials innerhalb dieser T-Zellsubpopulation bestätigt wird.

Die hier erzielten Ergebnisse weichen jedoch von denjenigen in BB Ratten und NOD Mäusen ab. In diesen konnte durch adoptive Transferversuche und selektive Depletion von T-Zellsubpopulationen gezeigt werden, dass $CD8^+$ T-Zellen allein oder synergistisch mit $CD4^+$ T-Zellen die Zerstörung der β -Zellen vermitteln (Miller *et al.* 1988; Bedossa *et al.* 1989; Nagata & Yoon 1992; Christianson *et al.* 1993; Edouard *et al.* 1993; Shimizu *et al.* 1993; Whalen *et al.* 1994). Durch Genexpressionsanalysen von isolierten Immunzellen aus der Milz und den Lymphknoten konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von regulatorischen T-Zellmarkern wie CD25 und FoxP3 in den diabetes-resistenten LEW.1AR1 Ratten höher ist als in diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten. Auf der anderen Seite nahm durch Stimulation mit dem Phytolektin Concanavalin A (ConA) das Expressionsniveau in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte zu, was erklärt, weshalb regulatorische T-Zellen aus diabetischen Ratten einen ebenso guten Schutz gegen autoaggressive T-Effektorzellen bieten wie ein adoptiver Transfer regulatorischer $CD8^+$ T-Zellen aus dem Hintergrundstamm LEW.1AR1. Das vorliegende Gleichgewicht zwischen Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen ist letztlich ausschlaggebend dafür, ob der durchgeführte adoptive Transfer zur Zerstörung der β -Zellen oder zum Schutz führt. Folglich kann diskutiert werden, dass es bei der *ex vivo* Stimulation zu einer unvollständigen Co-Aktivierung der Effektorzellen durch antigenpräsentierende Zellen kommt, was in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte zu der reduzierten Diabetesinzidenz nach Transfer von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen führt. In Kontrollversuchen wurden deshalb $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach einer ConA Stimulation vor und nach der Isolation der entsprechenden Subpopulationen untersucht. Interessanterweise war die Zellproliferation in beiden Gruppen bis zu dreifach erhöht. Das lässt darauf schließen, dass die isolierten T-Zellen bereits vor der Aufreinigung durch antigenpräsentierende Zellen stimuliert waren. Dennoch ist die Zellproliferation nicht indikativ für die Funktion von Effektorzellen, weshalb nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass die Kombination von ConA Stimulation und antigenpräsentierenden Zellen zu einer bevorzugten Proliferation von regulatorischen Zellen gegenüber Effektorzellen führt.

Das angewendete experimentelle Protokoll ist in Bezug auf die Balance zwischen regulatorischen T-Zellen und Effektorzellen nicht direkt vergleichbar mit der Situation in der NOD Maus oder der BB Ratte (Stephens & Mason 2000; Zipris *et al.* 2003; Lundsgaard *et al.* 2005). In BB Ratten und NOD Mäusen konnten regulatorische T-Zellen innerhalb der $CD4^+/CD25^+$ Zellfraktion identifiziert werden. In der *in vivo* Situation gibt es spezifische Unterschiede im Immunsystem, welche das Gleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen und T-Effektorzellen in diesen Tiermodellen beeinflussen (You *et al.* 2004; Lundsgaard *et al.*

2005). Die Tatsache, dass in dem LEW.1AR1-*iddm* Modell durch den Transfer von CD4⁺ T-Zellen auf die Empfänger kein Schutz übertragen werden kann, spricht nicht gegen die protektive Rolle von regulatorischen CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen, sondern zeigt vielmehr, dass unter den vorliegenden spezifischen Bedingungen diese Zellen nicht in der Lage sind, den T-Effektorzellen entgegen zu wirken.

3.3.1.2. Regulatorisches Potential der T-Zellen, insbesondere der CD8⁺ T-Zellen

Ein Transfer von pan T-Zellen aus diabetes-resistenten LEW.1AR1 Ratten reduziert die Diabetesinzidenz in LEW.1AR1-*iddm* Empfängertieren. Es ist bekannt, dass gewebsspezifische Autoimmunität durch CD4⁺ T-Zellsubpopulationen verhindert werden kann. Diese Zellen sind doppelt positiv für CD4⁺/CD25⁺ und tragen zusätzliche, für regulatorische T-Zellen spezifische Marker wie CD45RC^{low} (Hillebrands *et al.* 2006), Nrp1 (Neuropilin-1) (Bruder *et al.* 2004), FoxP3 (Chen *et al.* 2003; Feuerer *et al.* 2005) oder RT6a⁺ (Art2a) (Greiner *et al.* 1987; Whalen *et al.* 1994). Regulatorische CD4⁺ T-Zellen, die einen Schutz gegen den autoimmunen Diabetes übertragen, sind bekannt bei Menschen, Mäusen und Ratten (Stephens & Mason 2000; Chen *et al.* 2003; Gregori *et al.* 2003; Bisikirska & Herold 2005).

In der LEW.1AR1-*iddm* Ratte konnte durch den Transfer von CD8⁺ T-Zellen aus diabetischen und normoglykämischen Spendertieren die Diabetesinzidenz in prädiabetischen LEW.1AR1-*iddm* Empfängern reduziert werden. Nach bisherigen Erkenntnissen wurde bislang weder in den BB Ratten noch in den NOD Mäusen von einer protektiven Funktion von transferierten CD8⁺ T-Zellen unter *in vivo* Bedingungen berichtet. Allerdings konnten in NOD Mäusen bei einer *in vitro* Transduktion von Immunzellen mit FoxP3 sowohl regulatorische CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellsubpopulationen induziert werden (Peng *et al.* 2007). Es ist auch bekannt, dass es bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) eine hemmende Interaktion zwischen regulatorischen CD8⁺ T-Zellen und autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen gibt (Jiang *et al.* 1992; Jiang *et al.* 1998). Des Weiteren konnte diese Interaktion auch in Tiermodellen für andere Autoimmunerkrankungen sowie im humanen T1DM festgestellt werden (Bisikirska & Herold 2005; James & Kwok 2007). Interessanterweise konnte auch in anderen Organen, wie dem Auge, eine regulatorische Funktion von CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden, wobei hier die Iris Epithalzellen (IPE) *in vitro* in der Lage sind, T-Zellen in CD8⁺/CD25⁺ positive T_{reg}-Zellen zu konvertieren (Sugita *et al.* 2007).

Erstmalig konnten Veränderungen von regulatorischen T-Zellen im pankreas-drainierenden Lymphknoten in normoglykämischen LEW.1AR1-*iddm* Empfängertieren nach selektivem

CD8⁺ Transfer identifiziert werden. Sowohl regulatorische CD8⁺/CD25⁺ als auch CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen, welche FoxP3 co-exprimieren (Kretschmer *et al.* 2006), waren im Pankreas-drainierenden Lymphknoten in einer signifikant höhere Anzahl als bei diabetischen Empfängertieren vorhanden. Nach einem Transfer von CD4⁺ T-Zellen konnte kein Unterschied zwischen diabetischen und normoglykämischen Empfängertieren festgestellt werden, wobei die Immunzellichte hier den diabetischen Empfängern nach CD8⁺ Transfer entsprach. Für regulatorische CD4⁺ T-Zellen wurde postuliert, dass diese über einen Zytokin-vermittelten Mechanismus auf die Effektorzellen wirken (Kretschmer *et al.* 2006; Jaeckel *et al.* 2008). Genexpressionsanalysen von Zytokinen in Pankreas-drainierenden Lymphknoten nach CD8⁺ T-Zelltransfer zeigten eine deutliche Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ , sowie eine Zunahme der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 in durch den Transfer geschützten und somit nicht diabetischen Empfängertieren. Diese Ergebnisse belegen außerdem zum ersten Mal die Vermutung, dass regulatorische T-Zellen über IL-4, IL-10 und TGF- β Schutz vermitteln (Jaeckel *et al.* 2006; Kretschmer *et al.* 2006; Jaeckel *et al.* 2008).

Interessanterweise blieb das regulatorische Potential der CD8⁺ T-Zellen auch nach Diabetesmanifestation in den LEW.1AR1-*iddm* Ratten erhalten und war auf prädiabetische LEW.1AR1-*iddm* Empfängertiere transferierbar. Dieser protektive Effekt konnte durch eine Reduktion der Diabetesinzidenz von 60 % auf 20 % nach CD8⁺ T-Zelltransfer dokumentiert werden. Die klinische Relevanz dieser Transferexperimente wird durch die Ergebnisse einer Interventionsstudie an Typ 1 Patienten bestätigt, in der durch eine anti-CD3 Behandlung regulatorische CD8⁺/CD25⁺ T-Zellen induziert wurden, welche die Immunantwort von CD4⁺ T-Zellen auf spezifische Antigene unter *in vitro* Bedingungen unterdrückten und dadurch zum Erhalt der C-Peptid Produktion beitrugen (Bisikirska *et al.* 2005).

3.3.1.3. Perspektive

Der protektive Effekt von CD8⁺ T-Zellen in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte spiegelt die Situation wider, welche bei einer anti-CD3 Interventionsstudie bei Typ 1 Patienten beobachtet werden konnte. Somit ist die LEW.1AR1-*iddm* Ratte ein sehr geeignetes T1DM Tiermodell, um die Eigenschaften und die Wirkungsweise von regulatorischen CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen. Für diabetische Patienten wäre es sehr vielversprechend, wenn ihr zelluläres Immunsystem auch nach der Diabetesmanifestation noch regulatorisches Potential enthält, welches in der Lage ist, der Autoimmun-Zerstörung der β -Zellen entgegen zu wirken.

4. Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus ist die sozioökonomisch bedeutsamste Stoffwechselerkrankung in den westlichen Industrieländern, von der ca. 5 % der Bevölkerung betroffen sind. Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM), der ca. 10 % aller Diabeteserkrankungen ausmacht, entwickelt sich infolge einer progredienten Autoimmunzerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas und ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet. Da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zumeist > 90 % der β -Zellen bereits zerstört sind, spielen Tiermodelle eine entscheidende Rolle bei der Aufklärung der frühen Pathomechanismen der Erkrankung und der Entwicklung präventiver und kurativer Therapiekonzepte. In der vorliegenden Arbeit wird die LEW.1AR1-*iddm* Ratte als ein neues Tiermodell des T1DM vorgestellt. Dabei war es das Ziel, (1) die genetischen Ursachen der Krankheitsentstehung, (2) den Einfluss des heterogenen T-Zellanteils an der Diabetesmanifestation, sowie (3) die Mechanismen der Immunregulation in ihren Grundlagen zu charakterisieren.

Die LEW.1AR1-*iddm* Ratte, kurz auch IDDM Ratte genannt, entstand 1997 durch eine Spontanmutation in einem MHC congenen LEW.1AR1 Inzuchtstamm im Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover (Ztm). Die Entwicklung des T1DM folgt einem autosomal rezessiven Erbgang mit einer eingeschränkten Penetranz. So betrug die Inzidenz bei der Verpaarung von diabetischen Tieren ca. 60 %. Es lag bei den Tieren keine Geschlechtspräferenz vor, was mit der Situation beim Menschen vergleichbar ist. Um die genetische Prädisposition der LEW.1AR1-*iddm* Ratte aufzuklären, wurde in früheren Versuchen eine Rückkreuzungspopulation mit dem genetisch divergenten BN-Rattenstamm angelegt, womit insgesamt drei Suszeptibilitätsloci ermittelt werden konnten, die im zentromeren (*Iddm9*) und telomeren Bereich (*Iddm8*) auf Chromosom 1 (RNO1) und auf Chromosom 20 (RNO20) im Bereich des Haupthistokompatibilitäts-komplexes (MHC, *Iddm1*) kartieren. In dieser Studie wurde eine weitere Rückkreuzungspopulation mit dem genetisch divergenten PAR-Rattenstamm angelegt, welche 130 Tiere umfasste. Die Diabetesinzidenz betrug in der Rückkreuzungspopulation 16 %, was auf die Beteiligung von 2 – 3 Genen am Krankheitsprozess schließen lässt. Mittels einer Kopplungsanalyse unter Verwendung von 61 polymorphen Mikrosatellitenmarkern, sowie einer systematischen Feinkartierung, konnten 2 Suszeptibilitätsloci mit signifikanten LOD Scores identifiziert werden. In dieser Rückkreuzungspopulation konnte der *Iddm1* Bereich auf RNO20p12 (LOD score 3,2; MHC), sowie der *Iddm8* Bereich bestätigt werden. Der *Iddm9* Bereich zeigte in der PAR Rückkreuzungspopulation keine Kopplung zur T1DM Manifestation.

Die LEW.1AR1-*iddm* Ratte zeigte nicht nur den Phänotyp des T1DM, sondern auch einen weiteren Phänotyp eines heterogenen T-Zellanteils im peripheren Blut. Der LEW.1AR1-*iddm* Stamm zeichnete sich im Vergleich zum Hintergrundstamm LEW.1AR1 durch einen erniedrigten CD3⁺ T-Zellanteil aus. Auch der CD4⁺ T-Zellanteil war signifikant erniedrigt, wo hingegen der mittlere CD8⁺ T-Zellgehalt unverändert war. Alle T-Zellpopulationen zeigten jedoch zahlenmäßig eine starke Variabilität innerhalb der LEW.1AR1-*iddm* Population. Die Veränderungen in den T-Zellsubpopulationen beeinflussten auch die CD4⁺/CD8⁺ T-Zellratio. Eine Kopplungsanalyse zeigte eine Assoziation (LOD score = 11) zwischen dem Phänomen des veränderten Anteils an T-Zellen und dem Mikrosatellitenmarker *D1Rat295*, der am telomeren Ende von Chromosom 1 (RNO1q51) lokalisiert ist. Dieser Mikrosatellitenmarker ist außerdem identisch mit dem zuvor identifizierten *Iddm8* Locus. Durch zusätzliche KASPar (*Kbiosciences Allele Specific PCR*) Analysen konnte der *Iddm8* Bereich von 40 Mb auf 4 Mb eingegrenzt werden, so dass die Mutation, die sowohl für die T1DM Entwicklung als auch den heterogenen T-Zellanteil verantwortlich ist, vermutlich in dem Bereich RNO1q51 liegt.

Durch adoptiven Transfer ConA stimulierter Lymphozyten diabetischer Tiere auf immundefiziente LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* Ratten und prädiabetische LEW.1AR1-*iddm* Ratten konnte ein diabetisches Syndrom induziert, bzw. dessen Inzidenz erhöht werden. Die β -Zellzerstörung ist somit ursächlich als ein durch T-Lymphozyten vermitteltes Phänomen zu werten. Der selektive Transfer von CD4⁺ T-Zellen von diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Ratten auf athymische LEW.1AR1-*Whn^{tmu}* Ratten war in der Lage, einen Autoimmunprozess auszulösen, der zur T1DM Manifestation in 50 % der Empfängertiere führt, während ein Transfer von CD8⁺ T-Zellen keinen T1DM auslösen konnte. Nach einem kombinierten Transfer von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden nur 10 % der Empfängertiere diabetisch. Der diabetesresistente LEW.1AR1 Hintergrundstamm enthält regulatorische Immunzellen, die (a) eine Diabetesentstehung nach adoptivem Transfer von diabetischen Spendertieren verhinderten und (b) die Diabetesinzidenz nach adoptivem Transfer in prädiabetische LEW.1AR1-*iddm* Tiere signifikant von 60 % auf 25 % verminderten. Das regulatorische Potential konnte nur durch selektiven Transfer von CD8⁺ T-Zellen übertragen werden. Ein selektiver Transfer von CD8⁺ T-Zellen aus diabetischen LEW.1AR1-*iddm* Spendern in prädiabetische LEW.1AR1-*iddm* Empfänger bestätigte, dass auch in den kranken Tieren noch regulatorisches Potential vorhanden ist, da auch hier die Diabetesinzidenz signifikant von 60 % auf 20 % vermindert werden konnte. In geschützten, normoglykämischen Tieren akkumulierten regulatorische T-Zellsubpopulationen, CD8⁺/CD25⁺ und CD4⁺/CD25⁺ mit Co-

Expression von FoxP3, im pankreasdrainierenden Lymphknoten. Zusätzliche Genexpressionsanalysen zeigten im Vergleich zu diabetischen Empfängern eine verstärkte Expression von antiinflammatorischen Zytokinen, hauptsächlich IL-4, gegenüber proinflammatorischen Zytokinen.

Die LEW.1AR1-*iddm* Ratte zeigt im Gegensatz zu der BB Ratte und der NOD Maus keine Lymphopenie oder einen Defekt der NKT-Zellen, sowie keine Geschlechtsspezifität und entspricht damit der Situation des T1DM beim Menschen. Die festgestellten Veränderungen im Immunzellanteil sind interessanterweise auch im diabetischen Patienten zu beobachten. Das Wissen um die funktionelle Rolle des veränderten CD3⁺ T-Lymphozytenanteils könnte helfen, auch beim humanen T1DM den Mechanismus der Autoimmunität zu verstehen. Die Identifikation von regulatorischem Potential innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation bietet neue Möglichkeiten zur Untersuchung der regulatorischen Mechanismen dieser Subpopulation, was bei anderen Nagetiermodellen des T1DM bislang nicht möglich war. Erstmals konnte der pankreasdrainierende Lymphknoten als Ort der Regulation sowie die Wirkungsweise regulatorischer CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Nach der Identifizierung der diabetesrelevanten Mutation sollte es möglich sein, die Pathomechanismen von der deskriptiven Genetik bis hin zur funktionellen Relevanz für den Autoimmunprozess zu verfolgen. Dies eröffnet die Perspektive, neue Strategien für die Prävention und Therapie des T1DM beim Menschen zu entwickeln.

5. Anhang

5.1. *IDDM* Gene des humanen Genoms und ihre Lokalisation

Markername	Chromosomale Lokalisation	Assoziierter Marker/Gene
<i>IDDM1</i>	6p21	<i>HLA - DQB</i>
<i>IDDM2</i>	11p15	<i>INS - VNTR</i>
<i>IDDM3</i>	15q26	<i>D15S107</i>
<i>IDDM4</i>	11q13	<i>FGF3</i>
<i>IDDM5</i>	6q25	<i>ESR1</i>
<i>IDDM6</i>	18q21	<i>D18S64</i>
<i>IDDM7</i>	2q31	<i>D2S152</i>
<i>IDDM8</i>	6q27	<i>D6S264</i>
<i>IDDM9</i>	3q21 – q25	<i>D3S1576</i>
<i>IDDM10</i>	10p13 – q11	<i>D10S193</i> ; IL-2R (Reed <i>et al.</i> 1997)
<i>IDDM11</i>	14q24 – q31	<i>D14S67</i> (Field <i>et al.</i> 1996)
<i>IDDM12</i>	2q33	<i>CTLA4</i> (Nistico <i>et al.</i> 1996)
<i>IDDM13</i>	2q34	<i>D2S301</i> (Morahan <i>et al.</i> 1996)
<i>IDDM14</i>	2q34-35	(Morahan <i>et al.</i> 1996)
<i>IDDM15</i>	6q21	<i>D6S283</i> (Delepine <i>et al.</i> 1997)
<i>IDDM16</i>	14q32.32-q32.33	(Bonnievie-Nielsen <i>et al.</i> 2002)
<i>IDDM17</i>	10q25	<i>CASP7</i> (Babu <i>et al.</i> 2003)
<i>IDDM18</i>	5q33 – 34	<i>IL12B</i>
-	14q12 – q21	<i>D14S70 – 76</i>
-	16q22 – q24	<i>D16S515 – 520</i>
-	19p13	<i>D19S247 – 226</i>
-	19q13	<i>D19S225</i>
-	1q	<i>D1S1644 – AGT</i>
-	Xp13 – p11	<i>DX1068</i>

Tab. A1: *IDDM* Gene des humanen Genoms und ihre Lokalisation

Die *IDDM* Suszeptibilitätsgene sind nur teilweise mit Kandidatengenen assoziiert. Zumeist sind es Mikrosatellitenmarker, die in den jeweiligen Suszeptibilitätsregionen kartieren (Davies *et al.* 1994; Concannon *et al.* 1998; Mein *et al.* 1998).

5.2. Diabetessuszeptibilitätsregion der NOD Maus (*Idd* Gene) und deren Lokalisation im Genom

<i>Idd</i> Locus	Chromosom (MMU, cM)	Kandidatengene	Referenz
<i>Idd1</i>	17, 19.5cM	MHC Klasse I und II; <i>hsp70; bat5; tnfa; tnfb;</i> <i>tap1; tap2</i>	(Prochazka 1986; Wicker <i>et al.</i> 1995)
<i>Idd2</i>	9, 22.0cM	<i>thyl</i>	(Prochazka 1986; McAleer <i>et al.</i> 1995; Wicker <i>et al.</i> 1995)
<i>Idd3</i>	3, 19.2cM	<i>il2; fgf2; il21</i>	(Prochazka <i>et al.</i> 1987; Podolin <i>et al.</i> 1997; Hill <i>et al.</i> 2000; Lyons <i>et al.</i> 2000)
<i>Idd4</i>	11, 46.0cM		(Todd <i>et al.</i> 1991)
<i>Idd5</i>	1, 40cM	<i>ctla4</i>	(Cornall <i>et al.</i> 1991)
<i>Idd5a(1)</i>	1, synten	<i>casp8; flip; cd28; cd152;</i> <i>icos</i>	(Hill <i>et al.</i> 2000; Lamhamedi-Cherradi <i>et al.</i> 2001)
<i>Idd5b(2)</i>	1, synten	<i>nramp1; cxcr2</i>	(Hill <i>et al.</i> 2000; Lamhamedi-Cherradi <i>et al.</i> 2001)
<i>Idd6</i>	6, 73.0cM	NK-Komplex	(Ghosh <i>et al.</i> 1993; Brown <i>et al.</i> 1997)
<i>Idd7</i>	7, 4.0cM		(Ghosh <i>et al.</i> 1993)
<i>Idd8</i>	14, 3.5cM		(Ghosh <i>et al.</i> 1993)
<i>Idd9</i>	4, 82.0cM		(Eaves <i>et al.</i> 2002)
<i>Idd9.1</i>	4, synten	<i>jak1; lck</i>	(Lyons <i>et al.</i> 2000)
<i>Idd9.2</i>	4, synten	<i>cd30</i>	(Lyons <i>et al.</i> 2000; Siegmund <i>et al.</i> 2000)
<i>Idd9.3</i>	4, synten	<i>cd137</i>	(Lyons <i>et al.</i> 2000)
<i>Idd10</i>	3, 48.5cM		(Todd <i>et al.</i> 1991)
<i>Idd11</i>	4, 64.6cM	evt. identisch mit <i>Idd9.1</i>	(Morahan <i>et al.</i> 1994; Brodnicki <i>et al.</i> 2000)
<i>Idd12</i>	14, 12.0cM		(Morahan <i>et al.</i> 1994)
<i>Idd13</i>	2, 71.0cM	<i>Il1a</i>	(Serreze <i>et al.</i> 1994; Serreze <i>et al.</i> 1998)
<i>Idd13a</i>	2, synten	β-2-Mikroglobulin	(Serreze <i>et al.</i> 1998)
<i>Idd13b</i>	2, synten		(Serreze <i>et al.</i> 1998)
<i>Idd14</i>	13, synten		(McAleer <i>et al.</i> 1995)
<i>Idd15</i>	5, synten	<i>xmv65</i>	(McAleer <i>et al.</i> 1995)
<i>Idd16</i>	17, 18.0cM	<i>tnfa; hsp70; MHC Klasse I</i>	(Ikegami <i>et al.</i> 1995)
<i>Idd17</i>	3, 39.0cM		(Podolin <i>et al.</i> 1997)
<i>Idd18</i>	3, 53.3cM		(Podolin <i>et al.</i> 1998)
<i>Idd19</i>	6, 60.5cM		(Melanitou <i>et al.</i> 1998)
<i>Idd20</i>	6, 37.5cM		(Melanitou <i>et al.</i> 1998)
<i>Idd21</i>	18, 32.0cM		(Hall <i>et al.</i> 2003)

Tab. A2: *Idd* Gene des Mausgenoms und ihre Lokalisation

5.3. Diabetessuszeptibilitätsregionen der BB und KDP Ratte (*Iddm* Gene) und deren Lokalisation im Genom

<i>Iddm</i> Locus	Chromosom (RNO)	Kandidatengene - region	Referenz
<i>Iddm2</i> (<i>Lyp</i>)	4	<i>Ian411/Ian5</i> (identifizierte <i>Lyp</i> Mutation)	(Jacob <i>et al.</i> 1992; Hornum <i>et al.</i> 2002; MacMurray <i>et al.</i> 2002)
<i>Iddm1</i>	20	MHC Klasse II RT1B/D ^u	(Colle <i>et al.</i> 1981; Ellerman & Like 2000)
<i>Iddm3r</i> (<i>resistance</i>)	2	zwischen <i>D2Mit14</i> – <i>D2Mit15</i>	(Klaff <i>et al.</i> 1999)
<i>Iddm3</i>	18	<i>Olf</i>	(Klöting <i>et al.</i> 1995; Klöting <i>et al.</i> 1998b)
<i>Iddm4</i> (<i>Iddm11</i>)	6	<i>D6Mit1</i>	(Klöting <i>et al.</i> 1998a; Klöting <i>et al.</i> 1998b)
<i>Iddm4</i>	4	<i>Npy</i>	(Martin <i>et al.</i> 1999a; Martin <i>et al.</i> 1999b; Hornum <i>et al.</i> 2004)
<i>Iddm5</i>	13, ca. 5cM		(Martin <i>et al.</i> 1999a)
<i>Iddm5r</i>	1	<i>Igf2</i>	(Klöting <i>et al.</i> 1998b)
<i>Iddm6</i>	3, ca. 85cM		(Martin <i>et al.</i> 1999a)
<i>Iddm/kdp1</i>	11	<i>Cblb</i> (identifizierte Mutation)	(Yokoi <i>et al.</i> 2002)

Tab. A3: *Iddm* Gene des Rattengenoms und ihre Lokalisation

6. Literaturverzeichnis

ADA (1997). American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1997. *Diabetes Care* **20 Suppl 1**: S1-70.

ADA (1999). Clinical practise recommandations. *Diabetes Care*.

ADA (2003). Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**: 3160–3167.

Akerblom, H. K. & Knip, M. (1998). Putative environmental factors in Type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev* **14**: 31-67.

Al-Sakkaf, L., Pozzilli, P., Tarn, A. C., Schwarz, G., Gale, E. A. & Bottazzo, G. F. (1989). Persistent reduction of CD4/CD8 lymphocyte ratio and cell activation before the onset of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **32**: 322-325.

al Sakkaf, L., Pozzilli, P., Bingley, P. J., Lowdell, M. W., Thomas, J. M., Bonifacio, E., Gale, E. A. & Bottazzo, G. F. (1992). Early T-cell defects in pre-type 1 diabetes. *Acta diabetologica* **28**: 189-192.

Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* **15**: 539-553.

Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G. A., Clementi, M. & Chieco-Bianchi, L. (1995). Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nature medicine* **1**: 1279-1283.

Atkinson, M. A. & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* **358**: 221-229.

Babu, S. R., Bao, F., Roberts, C. M., Martin, A. K., Gowan, K., Eisenbarth, G. S. & Fain, P. R. (2003). Caspase 7 is a positional candidate gene for IDDM 17 in a Bedouin Arab family. *Ann N Y Acad Sci* **1005**: 340-343.

Bach, J. F. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* **15**: 516-542.

Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y. Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., Le, J., Ohashi, P. S., Sarosi, I., Nishina, H., Lipkowitz, S. & Penninger, J. M. (2000). Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* **403**: 211-216.

Baldeon, M. (2000). Diabetes and Immunity. In Nutrition and Immunity. Gershwin ME, G. J., Keen CL. Totowa, NJ, Humana Press301-312.

Baxter, A. G. & Cooke, A. (1993). Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* **42**: 1574-1578.

Bedossa, P., Bendelac, A., Bach, J. F. & Carnaud, C. (1989). Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol* **19**: 1947-1951.

Bellgrau, D., Naji, A., Silvers, W. K., Markmann, J. F. & Barker, C. F. (1982). Spontaneous diabetes in BB rats: evidence for a T cell dependent immune response defect. *Diabetologia* **23**: 359-364.

- Bennett, S. T., Lucassen, A. M., Gough, S. C., Powell, E. E., Undlien, D. E., Pritchard, L. E., Merriman, M. E., Kawaguchi, Y., Dronsfield, M. J., Pociot, F. & et al. (1995).** Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* **9**: 284-292.
- Bennett, S. T., Wilson, A. J., Cucca, F., Nerup, J., Pociot, F., McKinney, P. A., Barnett, A. H., Bain, S. C. & Todd, J. A. (1996).** IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. *J Autoimmun* **9**: 415-421.
- Benoist, C. & Mathis, D. (1997).** Cell death mediators in autoimmune diabetes--no shortage of suspects. *Cell* **89**: 1-3.
- Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. & Herold, K. C. (2005).** TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest* **115**: 2904-2913.
- Bisikirska, B. C. & Herold, K. C. (2005).** Regulatory T cells and type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* **5**: 104-109.
- Brodnicki, T. C., McClive, P., Couper, S. & Morahan, G. (2000).** Localization of Idd11 using NOD congenic mouse strains: elimination of Slc9a1 as a candidate gene. *Immunogenetics* **51**: 37-41.
- Brown, M. G., Fulmek, S., Matsumoto, K., Cho, R., Lyons, P. A., Levy, E. R., Scalzo, A. A. & Yokoyama, W. M. (1997).** A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics* **42**: 16-25.
- Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A. M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J. & Hansen, W. (2004).** Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* **34**: 623-630.
- Buschard, K. (1996).** Diabetic animal models. *Apmis* **104**: 609-614.
- Butler, L., Guberski, D. L. & Like, A. A. (1990).** Changes in penetrance and onset of spontaneous diabetes in the BB/Wor rat. In *Frontier in Diabetes Research II Lessons from Animal Diabetes*. Shafir, E. London, John Libbey 50-53.
- Canzian, F. (1997).** Phylogenetics of the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Genome Res* **7**: 262-267.
- Castro, M. A., Nunes, R. J., Oliveira, M. I., Tavares, P. A., Simoes, C., Parnes, J. R., Moreira, A. & Carmo, A. M. (2003).** OX52 is the rat homologue of CD6: evidence for an effector function in the regulation of CD5 phosphorylation. *J Leukoc Biol* **73**: 183-190.
- Chang, W. M., Chen, K. D., Chen, L. Y., Lai, M. T. & Lai, Y. K. (2003).** Mitochondrial calcium-mediated reactive oxygen species are essential for the rapid induction of the grp78 gene in 9L rat brain tumour cells. *Cell Signal* **15**: 57-64.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S. M. (2003).** Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**: 1875-1886.
- Chiang, Y. J., Kole, H. K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R. J., Jang, I. K., Gutkind, J. S., Shevach, E. & Gu, H. (2000).** Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* **403**: 216-220.
- Christen, U. & von Herrath, M. G. (2002).** Transgenic animal models for type 1 diabetes: linking a tetracycline-inducible promoter with a virus-inducible mouse model. *Transgenic Res* **11**: 587-595.

- Christianson, S. W., Shultz, L. D. & Leiter, E. H. (1993).** Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* **42**: 44-55.
- Colle, E., Guttman, R. D. & Seemayer, T. (1981).** Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. I. Association with the major histocompatibility complex. *J Exp Med* **154**: 1237-1242.
- Conaway, H. H., Brown, C. J., Sanders, L. L., Cernosek, S. F., Farris, H. E. & Roth, S. I. (1980).** Spontaneous diabetes mellitus in the New Zealand white rabbit: history, classification, and genetic analysis. *J Hered* **71**: 179-186.
- Concannon, P., Gogolin-Ewens, K. J., Hinds, D. A., Wapelhorst, B., Morrison, V. A., Stirling, B., Mitra, M., Farmer, J., Williams, S. R., Cox, N. J., Bell, G. I., Risch, N. & Spielman, R. S. (1998).** A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet* **19**: 292-296.
- Cornall, R. J., Prins, J. B., Todd, J. A., Pressey, A., DeLarato, N. H., Wicker, L. S. & Peterson, L. B. (1991).** Type 1 diabetes in mice is linked to the interleukin-1 receptor and Lsh/Ity/Bcg genes on chromosome 1. *Nature* **353**: 262-265.
- Crisa, L., Mordes, J. P. & Rossini, A. A. (1992).** Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes Metab Rev* **8**: 4-37.
- Davies, J. L., Cucca, F., Goy, J. V., Atta, Z. A., Merriman, M. E., Wilson, A., Barnett, A. H., Bain, S. C. & Todd, J. A. (1996).** Saturation multipoint linkage mapping of chromosome 6q in type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* **5**: 1071-1074.
- Davies, J. L., Kawaguchi, Y., Bennett, S. T., Copeman, J. B., Cordell, H. J., Pritchard, L. E., Reed, P. W., Gough, S. C., Jenkins, S. C., Palmer, S. M. & et al. (1994).** A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* **371**: 130-136.
- Degnbol, B. & Green, A. (1978).** Diabetes mellitus among first- and second-degree relatives of early onset diabetics. *Ann Hum Genet* **42**: 25-47.
- Eaves, I. A., Wicker, L. S., Ghandour, G., Lyons, P. A., Peterson, L. B., Todd, J. A. & Glynne, R. J. (2002).** Combining mouse congenic strains and microarray gene expression analyses to study a complex trait: the NOD model of type 1 diabetes. *Genome Res* **12**: 232-243.
- Edouard, P., Hiserodt, J. C., Plamondon, C. & Poussier, P. (1993).** CD8+ T-cells are required for adoptive transfer of the BB rat diabetic syndrome. *Diabetes* **42**: 390-397.
- Eisenbarth, G. S. (2008).** Type 1 Diabetes: Molecular, Cellular and Clinical Immunology. . Online Edition Version 2.5.
- Elder, M. E. & Maclaren, N. K. (1983).** Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat. *J Immunol* **130**: 1723-1731.
- Ellerman, K. E. & Like, A. A. (2000).** Susceptibility to diabetes is widely distributed in normal class IIu haplotype rats. *Diabetologia* **43**: 890-898.
- Evans, D. M., Frazer, I. H. & Martin, N. G. (1999).** Genetic and environmental causes of variation in basal levels of blood cells. *Twin Res* **2**: 250-257.
- Evans, D. M., Zhu, G., Duffy, D. L., Frazer, I. H., Montgomery, G. W. & Martin, N. G. (2004).** A major quantitative trait locus for CD4-CD8 ratio is located on chromosome 11. *Genes and immunity* **5**: 548-552.

- Fangmann, J., Schwinzer, R., Hedrich, H. J., Kloting, I. & Wonigeit, K. (1991).** Diabetes-prone BB rats express the RT6 alloantigen on intestinal intraepithelial lymphocytes. *European journal of immunology* **21**: 2011-2015.
- Faustman, D., Eisenbarth, G., Daley, J. & Breitmeyer, J. (1989).** Abnormal T-lymphocyte subsets in type I diabetes. *Diabetes* **38**: 1462-1468.
- Feuerer, M., Benoist, C. & Mathis, D. (2005).** Green T(R) cells. *Immunity* **22**: 271-272.
- Figuroa, F., Tewarson, S., Neufeld, E. & Klein, J. (1982).** H-2 haplotypes of strains DBR7, B10.NZW, NFS, BQ2, STU, TO1, and TO2. *Immunogenetics* **15**: 431-436.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2003).** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* **4**: 330-336.
- Fowell, D. & Mason, D. (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**: 627-636.
- Frisk, G., Hansson, T., Dahlbom, I. & Tuvemo, T. (2008).** A unifying hypothesis on the development of type 1 diabetes and celiac disease: Gluten consumption may be a shared causative factor. *Medical hypotheses* **70**: 1207-1209.
- Fujita, T. Y., R; Kusumoto, Y; Serizawa, Y; Makino, S; Tochino, Y (1982).** Lymphocytic insulinitis in a non-obese diabetic (NOD) strain of mice, an immunohistochemical and electron microscope investigation. *Biomed Res* **3**: 429-443.
- Ghosh, S., Palmer, S. M., Rodrigues, N. R., Cordell, H. J., Hearne, C. M., Cornall, R. J., Prins, J. B., McShane, P., Lathrop, G. M., Peterson, L. B. & et al. (1993).** Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Genet* **4**: 404-409.
- Gimferrer, I., Farnos, M., Calvo, M., Mittelbrunn, M., Enrich, C., Sanchez-Madrid, F., Vives, J. & Lozano, F. (2003).** The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *J Biol Chem* **278**: 8564-8571.
- Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D. & Butz, E. A. (2002).** Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* **195**: 1515-1522.
- Gregori, S., Giarratana, N., Smiroldo, S. & Adorini, L. (2003).** Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J Immunol* **171**: 4040-4047.
- Greiner, D. L., Mordes, J. P., Handler, E. S., Angelillo, M., Nakamura, N. & Rossini, A. A. (1987).** Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester (BB/W) rats. *The Journal of experimental medicine* **166**: 461-475.
- Guttman, R. D., Colle, E., Michel, F. & Seemayer, T. (1983).** Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. II. T lymphopenia and its association with clinical disease and pancreatic lymphocytic infiltration. *J Immunol* **130**: 1732-1735.
- Hall, R. J., Hollis-Moffatt, J. E., Merriman, M. E., Green, R. A., Baker, D. & Merriman, T. R. (2003).** An autoimmune diabetes locus (Idd21) on mouse chromosome 18. *Mamm Genome* **14**: 335-339.
- Han, G., Shao, H., Peng, Y., Zhang, P., Ke, Y., Kaplan, H. J. & Sun, D. (2007).** Suppressor role of rat CD8+CD45RClow T cells in experimental autoimmune uveitis (EAU). *J Neuroimmunol* **183**: 81-88.

- Han, J., Zhong, J., Wei, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, P., Purohit, S., Dong, Z., Wang, M. H., She, J. X., Gong, F., Stern, D. M. & Wang, C. Y. (2008).** Extracellular HMGB1 acts as an innate immune-mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes*.
- Hanenberg, H., Kolb-Bachofen, V., Kantwerk-Funke, G. & Kolb, H. (1989).** Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* **32**: 126-134.
- Hauner, H., Koster, I. & von Ferber, L. (2003).** [Prevalence of diabetes mellitus in Germany 1998-2001. Secondary data analysis of a health insurance sample of the AOK in Hesse/KV in Hesse]. *Dtsch Med Wochenschr* **128**: 2632-2637.
- Herold, K. C., Huen, A., Gould, L., Traisman, H. & Rubenstein, A. H. (1984).** Alterations in lymphocyte subpopulations in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: exploration of possible mechanisms and relationships to autoimmune phenomena. *Diabetologia* **27 Suppl**: 102-105.
- Herr, M., Dudbridge, F., Zavattari, P., Cucca, F., Guja, C., March, R., Campbell, R. D., Barnett, A. H., Bain, S. C., Todd, J. A. & Koeleman, B. P. (2000).** Evaluation of fine mapping strategies for a multifactorial disease locus: systematic linkage and association analysis of IDDM1 in the HLA region on chromosome 6p21. *Hum Mol Genet* **9**: 1291-1301.
- Hill, N. J., Lyons, P. A., Armitage, N., Todd, J. A., Wicker, L. S. & Peterson, L. B. (2000).** NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans. *Diabetes* **49**: 1744-1747.
- Hillebrands, J. L., Whalen, B., Visser, J. T., Koning, J., Bishop, K. D., Leif, J., Rozing, J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. & Rossini, A. A. (2006).** A regulatory CD4⁺ T cell subset in the BB rat model of autoimmune diabetes expresses neither CD25 nor Foxp3. *J Immunol* **177**: 7820-7832.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003a).** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, NY)* **299**: 1057-1061.
- Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2003b).** Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Adv Immunol* **81**: 331-371.
- Hornum, L., DeScipio, C., Markholst, H., Troutman, S. A., Novak, S., Leif, J., Greiner, D., Mordes, J. P. & Blankenhorn, E. P. (2004).** Comparative mapping of rat Iddm4 to segments on HSA7 and MMU6. *Mamm Genome* **15**: 53-61.
- Hornum, L., Romer, J. & Markholst, H. (2002).** The diabetes-prone BB rat carries a frameshift mutation in Irf4, a positional candidate of Iddm1. *Diabetes* **51**: 1972-1979.
- Hosszufalusi, N., Chan, E., Teruya, M., Takei, S., Granger, G. & Charles, M. A. (1993).** Quantitative phenotypic and functional analyses of islet immune cells before and after diabetes onset in the BB rat. *Diabetologia* **36**: 1146-1154.
- Hurt, P., Walter, L., Sudbrak, R., Klages, S., Muller, I., Shiina, T., Inoko, H., Lehrach, H., Gunther, E., Reinhardt, R. & Himmelbauer, H. (2004).** The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Res* **14**: 631-639.
- Hürter, P. & Lange, K. (1997).** Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. Klinik, Therapie, Rehabilitation. Heidelberg, Springer Verlag.
- Ikegami, H. & Makino, S. (2001).** The NOD Mouse and its Related Strains. In Animal Models of Diabetes - A Primer. Sima, A. A. F. & Shafir, E. London, Harwood Academic Publishers 43-63.

- Ikegami, H., Makino, S., Yamato, E., Kawaguchi, Y., Ueda, H., Sakamoto, T., Takekawa, K. & Ogihara, T. (1995).** Identification of a new susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus by ancestral haplotype congenic mapping. *J Clin Invest* **96**: 1936-1942.
- Jackson, R. A., Buse, J. B., Rifai, R., Pelletier, D., Milford, E. L., Carpenter, C. B., Eisenbarth, G. S. & Williams, R. M. (1984).** Two genes required for diabetes in BB rats. Evidence from cyclical intercrosses and backcrosses. *J Exp Med* **159**: 1629-1636.
- Jacob, H. J., Pettersson, A., Wilson, D., Mao, Y., Lernmark, A. & Lander, E. S. (1992).** Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat. *Nat Genet* **2**: 56-60.
- Jaeckel, E., Kretschmer, K., Apostolou, I. & von Boehmer, H. (2006).** Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Seminars in immunology* **18**: 89-92.
- Jaeckel, E., Mpofu, N., Saal, N. & Manns, M. P. (2008).** Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research Hormon- und Stoffwechselforschung* **40**: 126-136.
- James, E. A. & Kwok, W. W. (2007).** CD8⁺ suppressor-mediated regulation of human CD4⁺ T cell responses to glutamic acid decarboxylase 65. *Eur J Immunol* **37**: 78-86.
- Jiang, H., Kashleva, H., Xu, L. X., Forman, J., Flaherty, L., Pernis, B., Braunstein, N. S. & Chess, L. (1998).** T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4533-4537.
- Jiang, H., Zhang, S. I. & Pernis, B. (1992).** Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* **256**: 1213-1215.
- Jiang, Z., Handler, E. S., Rossini, A. A. & Woda, B. A. (1990).** Immunopathology of diabetes in the RT6-depleted diabetes-resistant BB/Wor rat. *The American journal of pathology* **137**: 767-777.
- Joner, G. & Sovik, O. (1989).** Increasing incidence of diabetes mellitus in Norwegian children 0-14 years of age 1973-1982. *Diabetologia* **32**: 79-83.
- Jörns, A., Günther, A., Hedrich, H. J., Wedekind, D., Tiedge, M. & Lenzen, S. (2005).** Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes* **54**: 2041-2052.
- Jörns, A., Kubat, B., Tiedge, M., Wedekind, D., Hedrich, H. J., Kloppel, G. & Lenzen, S. (2004).** Pathology of the pancreas and other organs in the diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat, a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Virchows Arch* **444**: 183-189.
- Jun, H. S. & Yoon, J. W. (2001).** The role of viruses in type I diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia* **44**: 271-285.
- Kaaba, S. A. & Al-Harbi, S. A. (1995).** Abnormal lymphocyte subsets in Kuwaiti patients with type-1 insulin-dependent diabetes mellitus and their first-degree relatives. *Immunology letters* **47**: 209-213.
- Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, I., LaPorte, R. & Tuomilehto, J. (2000).** Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* **23**: 1516-1526.

- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M. & Natori, T. (1991).** New inbred strain of Long-Evans Tokushima lean rats with IDDM without lymphopenia. *Diabetes* **40**: 1375-1381.
- Kerner, W., Fuchs, C., Redaelli, M., Böhm, B.O., Köbberling, J., Scherbaum, W.A., Tillil, H. (2001).** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Bochum, Deutsche Diabetes Gesellschaft e.V. (DDG).
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S. A. & Ramsdell, F. (2003).** An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology* **4**: 337-342.
- Kikutani, H. & Makino, S. (1992).** The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* **51**: 285-322.
- Kimura, M., Tanaka, S., Isoda, F., Sekigawa, K., Yamakawa, T. & Sekihara, H. (1998).** T lymphopenia in obese diabetic (db/db) mice is non-selective and thymus independent. *Life sciences* **62**: 1243-1250.
- Kishimoto, H. & Sprent, J. (2001).** A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* **2**: 1025-1031.
- Klaff, L. S., Koike, G., Jiang, J., Wang, Y., Bieg, S., Pettersson, A., Lander, E., Jacob, H. & Lernmark, A. (1999).** BB rat diabetes susceptibility and body weight regulation genes colocalize on chromosome 2. *Mamm Genome* **10**: 883-887.
- Klein, J. & Figueroa, F. (1986).** Evolution of the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol* **6**: 295-386.
- Klein, J., Figueroa, F. & Klein, D. (1982).** H-2 haplotypes, genes, and antigens: second listing. I. Non-H-2 loci on chromosome 17. *Immunogenetics* **16**: 285-317.
- Klötting, I., Kovacs, P. & Kuttler, B. (1997).** Phenotypic consequences after restoration of lymphopenia in the diabetes-prone BB/OK rat. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 106-110.
- Klötting, I., Schmidt, S. & Kovacs, P. (1998a).** Mapping of novel genes predisposing or protecting diabetes development in the BB/OK rat. *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 483-486.
- Klötting, I., Vogt, L. & Serikawa, T. (1995).** Locus on chromosome 18 cosegregates with diabetes in the BB/OK rat subline. *Diabete Metab* **21**: 338-344.
- Klötting, I. I., van den Brandt, J. & Kovacs, P. (1998b).** Quantitative trait loci for blood glucose confirm diabetes predisposing and protective genes, Iddm4 and Iddm5r, in the spontaneously diabetic BB/OK rat. *Int J Mol Med* **2**: 597-601.
- Knip, M. (2002).** Natural course of preclinical type 1 diabetes. *Horm Res* **57 Suppl 1**: 6-11.
- Koevary, S., Rossini, A., Stoller, W., Chick, W. & Williams, R. M. (1983).** Passive transfer of diabetes in the BB/W rat. *Science* **220**: 727-728.
- Kolb, H. (1987).** Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev* **3**: 751-778.
- Komeda, K., Noda, M., Terao, K., Kuzuya, N., Kanazawa, M. & Kanazawa, Y. (1998).** Establishment of two substrains, diabetes-prone and non-diabetic, from Long-Evans Tokushima Lean (LETL) rats. *Endocr J* **45**: 737-744.
- Kraal, G., Weissman, I. L. & Butcher, E. C. (1983).** Genetic control of T-cell subset representation in inbred mice. *Immunogenetics* **18**: 585-592.

- Kramer, J. W., Nottingham, S., Robinette, J., Lenz, G., Sylvester, S. & Dessouky, M. I. (1980).** Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of Keeshond dogs. *Diabetes* **29**: 558-565.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Jaeckel, E., Khazaie, K. & von Boehmer, H. (2006).** Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunological reviews* **212**: 163-169.
- Krolewski, A. S., Warram, J. H., Rand, L. I. & Kahn, C. R. (1987).** Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* **317**: 1390-1398.
- Krupica, T., Jr., Fry, T. J. & Mackall, C. L. (2006).** Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **120**: 121-128.
- Lally, F. J. & Bone, A. J. (2003).** Animal models of type 1 diabetes. In Textbook of Diabetes. J.C., P. & G., W. Oxford, Blackwell Scientific Publications 19.11-19.17.
- Lamhamedi-Cherradi, S. E., Boulard, O., Gonzalez, C., Kassis, N., Damotte, D., Eloy, L., Fluteau, G., Levi-Strauss, M. & Garchon, H. J. (2001).** Further mapping of the Idd5.1 locus for autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* **50**: 2874-2878.
- Lampeter, E. F., McCann, S. R. & Kolb, H. (1998).** Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet* **351**: 568-569.
- Lapolla, A., Dalfra, M. G., Sanzari, M., Fedele, D., Betterle, C., Masin, M., Zanchetta, R., Faggian, D., Masotti, M., Nucera, V. & Plebani, M. (2005).** Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine* **31**: 280-287.
- Laupacis, A., Stiller, C. R., Gardell, C., Keown, P., Dupre, J., Wallace, A. C. & Thibert, P. (1983).** Cyclosporin prevents diabetes in BB Wistar rats. *Lancet* **1**: 10-12.
- Legendre, C. M., Schiffrin, A., Weitzner, G., Colle, E. & Guttmann, R. D. (1988).** Two-color flow cytometry analysis of activated T-lymphocyte subsets in type I diabetes mellitus. *Diabetes* **37**: 792-795.
- Lenzen, S. (2007).** Alloxan and streptozotocin diabetes. In Endocrinology III lectures within the "time structures of endocrine systems" project framework. E, P. Stuttgart/Leipzig, Verlag der Sächsischen Akademie der Wissenschaften, S. Hirzel Verlag 119-138.
- Lenzen, S. (2008a).** The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* **51**: 216-226.
- Lenzen, S. (2008b).** Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochemical Society transactions* **36**: 343-347.
- Lenzen, S., Tiedge, M., Elsner, M., Lortz, S., Weiss, H., Jörns, A., Kloppel, G., Wedekind, D., Prokop, C. M. & Hedrich, H. J. (2001).** The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**: 1189-1196.
- Like, A. A., Anthony, M., Guberski, D. L. & Rossini, A. A. (1983).** Spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. Effects of glucocorticoids, cyclosporin-A, and antiserum to rat lymphocytes. *Diabetes* **32**: 326-330.
- Like, A. A., Kislauskis, E., Williams, R. R. & Rossini, A. A. (1982).** Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science* **216**: 644-646.

- Like, A. A., Rossini, A. A., Guberski, D. L., Appel, M. C. & Williams, R. M. (1979).** Spontaneous diabetes mellitus: reversal and prevention in the BB/W rat with antiserum to rat lymphocytes. *Science* **206**: 1421-1423.
- Like, A. A., Weringer, E. J., Holdash, A., McGill, P., Atkinson, D. & Rossini, A. A. (1985).** Adoptive transfer of autoimmune diabetes mellitus in biobreeding/Worcester (BB/W) inbred and hybrid rats. *J Immunol* **134**: 1583-1587.
- Liu, D., Darville, M. & Eizirik, D. L. (2001).** Double-stranded ribonucleic acid (RNA) induces beta-cell Fas messenger RNA expression and increases cytokine-induced beta-cell apoptosis. *Endocrinology* **142**: 2593-2599.
- Logothetopoulos, J., Valiquette, N., MacGregor, D. & Hsia, T. (1987).** Adoptive transfer of insulinitis and diabetes in neonates of diabetes-prone and -resistant rats. Tissue localization of injected blasts. *Diabetes* **36**: 1116-1123.
- Lundsgaard, D., Holm, T. L., Hornum, L. & Markholst, H. (2005).** In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4+CD25+ T-cells expressing Foxp3. *Diabetes* **54**: 1040-1047.
- Luo, D. F., Bui, M. M., Muir, A., Maclaren, N. K., Thomson, G. & She, J. X. (1995).** Affected-sib-pair mapping of a novel susceptibility gene to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM8) on chromosome 6q25-q27. *Am J Hum Genet* **57**: 911-919.
- Luo, D. F., Buzzetti, R., Rotter, J. I., Maclaren, N. K., Raffel, L. J., Nistico, L., Giovannini, C., Pozzilli, P., Thomson, G. & She, J. X. (1996).** Confirmation of three susceptibility genes to insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM4, IDDM5 and IDDM8. *Hum Mol Genet* **5**: 693-698.
- Lyons, P. A., Hancock, W. W., Denny, P., Lord, C. J., Hill, N. J., Armitage, N., Siegmund, T., Todd, J. A., Phillips, M. S., Hess, J. F., Chen, S. L., Fischer, P. A., Peterson, L. B. & Wicker, L. S. (2000).** The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137. *Immunity* **13**: 107-115.
- MacMurray, A. J., Moralejo, D. H., Kwitek, A. E., Rutledge, E. A., Van Yserloo, B., Gohlke, P., Speros, S. J., Snyder, B., Schaefer, J., Bieg, S., Jiang, J., Ettinger, R. A., Fuller, J., Daniels, T. L., Pettersson, A., Orlebeke, K., Birren, B., Jacob, H. J., Lander, E. S. & Lernmark, A. (2002).** Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel immune-associated nucleotide (Ian)-related gene. *Genome Res* **12**: 1029-1039.
- Makino, S., Hayashi, Y., Muraoka, Y. & Tochino, Y. (1985).** Establishment of the nonobese-diabetic (NOD) mouse. In Current topics in clinical and experimental aspects of diabetes mellitus. Sakamoto, T., Min, H. K. & Baba, S. London, Elsevier Science Publisher 25-32.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K. & Tochino, Y. (1980).** Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* **29**: 1-13.
- Mandrup-Poulsen, T. (2001).** beta-cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes* **50 Suppl 1**: S58-63.
- Marleau, A. M. & Sarvetnick, N. (2005).** T cell homeostasis in tolerance and immunity. *Journal of leukocyte biology* **78**: 575-584.
- Martin, A. M., Blankenhorn, E. P., Maxson, M. N., Zhao, M., Leif, J., Mordes, J. P. & Greiner, D. L. (1999a).** Non-major histocompatibility complex-linked diabetes susceptibility

loci on chromosomes 4 and 13 in a backcross of the DP-BB/Wor rat to the WF rat. *Diabetes* **48**: 50-58.

Martin, A. M., Maxson, M. N., Leif, J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. & Blankenhorn, E. P. (1999b). Diabetes-prone and diabetes-resistant BB rats share a common major diabetes susceptibility locus, iddm4: additional evidence for a "universal autoimmunity locus" on rat chromosome 4. *Diabetes* **48**: 2138-2144.

McAleer, M. A., Reifsnyder, P., Palmer, S. M., Prochazka, M., Love, J. M., Copeman, J. B., Powell, E. E., Rodrigues, N. R., Prins, J. B., Serreze, D. V. & et al. (1995). Crosses of NOD mice with the related NON strain. A polygenic model for IDDM. *Diabetes* **44**: 1186-1195.

McKeever, U., Mordes, J. P., Greiner, D. L., Appel, M. C., Rozing, J., Handler, E. S. & Rossini, A. A. (1990). Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7618-7622.

Meier, H. & Yerganian, G. A. (1959). Spontaneous hereditary diabetes mellitus in Chinese hamster. I. Pathological findings. *Proc Soc Exp Biol Med* **100**: 810.

Mein, C. A., Esposito, L., Dunn, M. G., Johnson, G. C., Timms, A. E., Goy, J. V., Smith, A. N., Sebag-Montefiore, L., Merriman, M. E., Wilson, A. J., Pritchard, L. E., Cucca, F., Barnett, A. H., Bain, S. C. & Todd, J. A. (1998). A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat Genet* **19**: 297-300.

Melanitou, E., Joly, F., Lathrop, M., Boitard, C. & Avner, P. (1998). Evidence for the presence of insulin-dependent diabetes-associated alleles on the distal part of mouse chromosome 6. *Genome Res* **8**: 608-620.

Metroz-Dayer, M. D., Moulard, A., Brideau, C., Duhamel, D. & Poussier, P. (1990). Adoptive transfer of diabetes in BB rats induced by CD4 T lymphocytes. *Diabetes* **39**: 928-932.

Miller, B. J., Appel, M. C., O'Neil, J. J. & Wicker, L. S. (1988). Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **140**: 52-58.

Min, B., Foucras, G., Meier-Schellersheim, M. & Paul, W. E. (2004). Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3874-3879.

Mojcik, C. F., Greiner, D. L., Medlock, E. S., Komschlies, K. L. & Goldschneider, I. (1988). Characterization of RT6 bearing rat lymphocytes. I. Ontogeny of the RT6+ subset. *Cell Immunol* **114**: 336-346.

Mooij, P., de Wit, H. J. & Drexhage, H. A. (1993). An excess of dietary iodine accelerates the development of a thyroid-associated lymphoid tissue in autoimmune prone BB rats. *Clin Immunol Immunopathol* **69**: 189-198.

Morahan, G., McClive, P., Huang, D., Little, P. & Baxter, A. (1994). Genetic and physiological association of diabetes susceptibility with raised Na⁺/H⁺ exchange activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5898-5902.

Mordes, J. P., Bortell, R., Groen, H., Guberski, D., Rossini, A. A. & Greiner, D. L. (2001). Autoimmune Diabetes Mellitus in the BB Rat. In *Animal Models of Diabetes - A Primer*. Sima, A. A. F. & Shafir, E. London, Harwood Academic Publishers 1-43.

- Mordes, J. P., Gallina, D. L., Handler, E. S., Greiner, D. L., Nakamura, N., Pelletier, A. & Rossini, A. A. (1987).** Transfusions enriched for W3/25+ helper/inducer T lymphocytes prevent spontaneous diabetes in the BB/W rat. *Diabetologia* **30**: 22-26.
- Mori, K., Mori, M., Stone, S., Braverman, L. E. & DeVito, W. J. (1998).** Increased expression of tumor necrosis factor-alpha and decreased expression of thyroglobulin and thyroid peroxidase mRNA levels in the thyroids of iodide-treated BB/Wor rats. *Eur J Endocrinol* **139**: 539-545.
- Moriyama, H., Wen, L., Abiru, N., Liu, E., Yu, L., Miao, D., Gianani, R., Wong, F. S. & Eisenbarth, G. S. (2002).** Induction and acceleration of insulinitis/diabetes in mice with a viral mimic (polyinosinic-polycytidylic acid) and an insulin self-peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5539-5544.
- Munger, B. L. & Lang, C. M. (1973).** Spontaneous diabetes mellitus in guinea pigs: the acute cytopathology of the islets of Langerhans. *Lab Invest* **29**: 685-702.
- Nagata, M. & Yoon, J. W. (1992).** Studies on autoimmunity for T-cell-mediated beta-cell destruction. Distinct difference in beta-cell destruction between CD4+ and CD8+ T-cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. *Diabetes* **41**: 998-1008.
- Naji, A., Silvers, W. K., Bellgrau, D. & Barker, C. F. (1981).** Spontaneous diabetes in rats: destruction of islets is prevented by immunological tolerance. *Science* **213**: 1390-1392.
- Naji, A., Silvers, W. K., Plotkin, S. A., Dafoe, D. & Barker, C. F. (1979).** Successful islet transplantation in spontaneous diabetes. *Surgery* **86**: 218-226.
- Nakhooda, A. F., Like, A. A., Chappel, C. I., Murray, F. T. & Marliss, E. B. (1977).** The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* **26**: 100-112.
- Nerup, J., Mandrup-Poulsen, T., Helqvist, S., Andersen, H. U., Pociot, F., Reimers, J. I., Cuartero, B. G., Karlsen, A. E., Bjerre, U. & Lorenzen, T. (1994).** On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* **37 Suppl 2**: S82-89.
- Nerup, J., Platz, P., Andersen, O. O., Christy, M., Lyngsoe, J., Poulsen, J. E., Ryder, L. P., Nielsen, L. S., Thomsen, M. & Svejgaard, A. (1974).** HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* **2**: 864-866.
- Nijman, I. J., Kuipers, S., Verheul, M., Guryev, V. & Cuppen, E. (2008).** A genome-wide SNP panel for mapping and association studies in the rat. *BMC genomics* **9**: 95.
- Ogawa, M. M., T; Hasegawa, T; Kanaya, F; Tochino, Y; Uda, H (1985).** The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Biomed Res* **6**: 103-105.
- Oh-hashii, K., Naruse, Y., Amaya, F., Shimosato, G. & Tanaka, M. (2003).** Cloning and characterization of a novel GRP78-binding protein in the rat brain. *J Biol Chem* **278**: 10531-10537.
- Olmos, P., A'Hern, R., Heaton, D. A., Millward, B. A., Risley, D., Pyke, D. A. & Leslie, R. D. (1988).** The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* **31**: 747-750.
- Pandarpurkar, M., Wilson-Fritch, L., Corvera, S., Markholst, H., Hornum, L., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Rossini, A. A. & Bortell, R. (2003).** Irf4 is required for mitochondrial integrity and T cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10382-10387.
- Peakman, M., Warnock, T., Vats, A., McNab, G. L., Underhill, J., Donaldson, P. T. & Vergani, D. (1994).** Lymphocyte subset abnormalities, autoantibodies and their relationship

with HLA DR types in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes and their first degree relatives. *Diabetologia* **37**: 155-165.

Pedersen, C., Dickmeiss, E., Gaub, J., Ryder, L. P., Platz, P., Lindhardt, B. O. & Lundgren, J. D. (1990). T-cell subset alterations and lymphocyte responsiveness to mitogens and antigen during severe primary infection with HIV: a case series of seven consecutive HIV seroconverters. *AIDS (London, England)* **4**: 523-526.

Peng, J., Dicker, B., Du, W., Tang, F., Nguyen, P., Geiger, T., Wong, F. S. & Wen, L. (2007). Converting antigen-specific diabetogenic CD4 and CD8 T cells to TGF-beta producing non-pathogenic regulatory cells following FoxP3 transduction. *J Autoimmun* **28**: 188-200.

Petersen, L. D., Duinkerken, G., Bruining, G. J., van Lier, R. A., de Vries, R. R. & Roep, B. O. (1996). Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of autoimmunity* **9**: 731-737.

Pickup, J. C. & Williams, G. (2003). Textbook of Diabetes 1. Oxford, Blackwell.

Pinkse, G. G., Tysma, O. H., Bergen, C. A., Kester, M. G., Ossendorp, F., van Veelen, P. A., Keymeulen, B., Pipeleers, D., Drijfhout, J. W. & Roep, B. O. (2005). Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18425-18430.

Podolin, P. L., Denny, P., Armitage, N., Lord, C. J., Hill, N. J., Levy, E. R., Peterson, L. B., Todd, J. A., Wicker, L. S. & Lyons, P. A. (1998). Localization of two insulin-dependent diabetes (Idd) genes to the Idd10 region on mouse chromosome 3. *Mamm Genome* **9**: 283-286.

Podolin, P. L., Denny, P., Lord, C. J., Hill, N. J., Todd, J. A., Peterson, L. B., Wicker, L. S. & Lyons, P. A. (1997). Congenic mapping of the insulin-dependent diabetes (Idd) gene, Idd10, localizes two genes mediating the Idd10 effect and eliminates the candidate Fcgr1. *J Immunol* **159**: 1835-1843.

Pontesilli, O., Chase, H. P., Carotenuto, P., Herberger, M. J. & Hayward, A. R. (1986). T-lymphocyte subpopulations in insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Clinical and experimental immunology* **63**: 68-72.

Poulton, L. D., Smyth, M. J., Hawke, C. G., Silveira, P., Shepherd, D., Naidenko, O. V., Godfrey, D. I. & Baxter, A. G. (2001). Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *International immunology* **13**: 887-896.

Prins, J. H., L; den Bieman, M; van Zutphen, B (2001). Genetic variation within and between lines of diabetes-prone and non-diabetes-prone BB rats: Allele distribution of 8 protein markers. *Lab Anim* **25**: 207-211.

Prlic, M., Blazar, B. R., Khoruts, A., Zell, T. & Jameson, S. C. (2001). Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J Immunol* **167**: 5664-5668.

Prlic, M. & Jameson, S. C. (2002). Homeostatic expansion versus antigen-driven proliferation: common ends by different means? *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4**: 531-537.

Prochazka, M., Leiter, E. H., Serreze, D. V. & Coleman, D. L. (1987). Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice. *Science* **237**: 286-289.

Prochazka, M. L., PH; Serreze, D; Coleman, D; Leiter, EH (1986). Genetic control of insulin-dependent diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Mouse News Lett* **75**.

- Rabinovitch, A. (1998).** Animal models of type 1 diabetes are relevant to human IDDM--use caution. *Diabetes Metab Rev* **14**: 189-190.
- Ramanathan, S. & Poussier, P. (2001).** BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev* **184**: 161-171.
- Reddy, S., Wu, D., Swinney, C. & Elliott, R. B. (1995).** Immunohistochemical analyses of pancreatic macrophages and CD4 and CD8 T cell subsets prior to and following diabetes in the NOD mouse. *Pancreas* **11**: 16-25.
- Reimers, J. I., Rasmussen, A. K., Karlsen, A. E., Bjerre, U., Liang, H., Morin, O., Andersen, H. U., Mandrup-Poulsen, T., Burger, A. G., Feldt-Rasmussen, U. & Nerup, J. (1996).** Interleukin-1 beta inhibits rat thyroid cell function in vivo and in vitro by an NO-independent mechanism and induces hypothyroidism and accelerated thyroiditis in diabetes-prone BB rats. *J Endocrinol* **151**: 147-157.
- Richens, E. R. & Jones, W. G. (1985).** T-lymphocyte subpopulations in type I diabetes mellitus. A longitudinal study. *Acta diabetologica latina* **22**: 229-238.
- Risch, N. (1987).** Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* **40**: 1-14.
- Roep, B. O. (2003).** The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* **46**: 305-321.
- Rossini, A. A., Faustman, D., Woda, B. A., Like, A. A., Szymanski, I. & Mordes, J. P. (1984a).** Lymphocyte transfusions prevent diabetes in the Bio-Breeding/Worcester rat. *J Clin Invest* **74**: 39-46.
- Rossini, A. A., Mordes, J. P., Pelletier, A. M. & Like, A. A. (1983).** Transfusions of whole blood prevent spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science* **219**: 975-977.
- Rossini, A. A., Slavin, S., Woda, B. A., Geisberg, M., Like, A. A. & Mordes, J. P. (1984b).** Total lymphoid irradiation prevents diabetes mellitus in the Bio-Breeding/Worcester (BB/W) rat. *Diabetes* **33**: 543-547.
- Sakaguchi, S. (2000).** Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* **12**: 684-690.
- Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N. (1994).** Thymus, T cells and autoimmunity: various causes but a common mechanism of autoimmune disease. In *Autoimmunity: Physiology and Disease*. Coutinho, A. & Kazatchkine, M. New York, Wiley-Liss 203-227.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995).** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**: 1151-1164.
- Sakaguchi, S., Toda, M., Asano, M., Itoh, M., Morse, S. S. & Sakaguchi, N. (1996).** T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* **9**: 211-220.
- Sakata, K., Yamashita, T., Maeda, M., Moriyama, Y., Shimada, S. & Tohyama, M. (2001).** Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem J* **356**: 53-60.
- Sanjeevi, C. B. (2000).** HLA-DQ6-mediated protection in IDDM. *Hum Immunol* **61**: 148-153.

- Schuler, T., Hammerling, G. J. & Arnold, B. (2004).** Cutting edge: IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD8⁺ T cells in neonatal mice allows the generation of long-lived natural memory T cells. *J Immunol* **172**: 15-19.
- Sempe, P., Ezine, S., Marvel, J., Bedossa, P., Richard, M. F., Bach, J. F. & Boitard, C. (1993).** Role of CD4⁺CD45RA⁺ T cells in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Int Immunol* **5**: 479-489.
- Serreze, D. V. (1993).** Autoimmune diabetes results from genetic defects manifest by antigen presenting cells. *Faseb J* **7**: 1092-1096.
- Serreze, D. V., Bridgett, M., Chapman, H. D., Chen, E., Richard, S. D. & Leiter, E. H. (1998).** Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin. *J Immunol* **160**: 1472-1478.
- Serreze, D. V., Gaskins, H. R. & Leiter, E. H. (1993).** Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *J Immunol* **150**: 2534-2543.
- Serreze, D. V., Hamaguchi, K. & Leiter, E. H. (1989).** Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/Lt mice. *J Autoimmun* **2**: 759-776.
- Serreze, D. V. & Leiter, E. H. (2001).** Genes and cellular requirements for autoimmune diabetes susceptibility in nonobese diabetic mice. *Current directions in autoimmunity* **4**: 31-67.
- Serreze, D. V., Prochazka, M., Reifsnnyder, P. C., Bridgett, M. M. & Leiter, E. H. (1994).** Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med* **180**: 1553-1558.
- Shimizu, J., Kanagawa, O. & Unanue, E. R. (1993).** Presentation of beta-cell antigens to CD4⁺ and CD8⁺ T cells of non-obese diabetic mice. *J Immunol* **151**: 1723-1730.
- Siegmund, T., Armitage, N., Wicker, L. S., Peterson, L. B., Todd, J. A. & Lyons, P. A. (2000).** Analysis of the mouse CD30 gene: a candidate for the NOD mouse type 1 diabetes locus Idd9.2. *Diabetes* **49**: 1612-1616.
- Smith, T. R. & Kumar, V. (2008).** Revival of CD8(+) Treg-mediated suppression. *Trends in immunology*.
- Sobel, D. O., Ewel, C. H., Zeligs, B., Abbassi, V., Rossio, J. & Bellanti, J. A. (1994).** Poly I:C induction of alpha-interferon in the diabetes-prone BB and normal Wistar rats. Dose-response relationships. *Diabetes* **43**: 518-522.
- Sobel, D. O., Newsome, J., Ewel, C. H., Bellanti, J. A., Abbassi, V., Creswell, K. & Blair, O. (1992).** Poly I:C induces development of diabetes mellitus in BB rat. *Diabetes* **41**: 515-520.
- Spooren, P. F., Vermes, I. & Soons, J. W. (1993).** Similar alterations of lymphocyte subpopulations in type I and type II diabetes. *The Netherlands journal of medicine* **42**: 163-167.
- Stead, J. D., Buard, J., Todd, J. A. & Jeffreys, A. J. (2000).** Influence of allele lineage on the role of the insulin minisatellite in susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* **9**: 2929-2935.
- Stephens, L. A. & Mason, D. (2000).** CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations. *J Immunol* **165**: 3105-3110.

- Stratmann, T., Martin-Orozco, N., Mallet-Designé, V., Poirot, L., McGavern, D., Losyev, G., Dobbs, C. M., Oldstone, M. B., Yoshida, K., Kikutani, H., Mathis, D., Benoist, C., Haskins, K. & Teyton, L. (2003).** Susceptible MHC alleles, not background genes, select an autoimmune T cell reactivity. *The Journal of clinical investigation* **112**: 902-914.
- Sugita, S., Futagami, Y., Horie, S. & Mochizuki, M. (2007).** Transforming growth factor beta-producing Foxp3(+)CD8(+)CD25(+) T cells induced by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions. *Experimental eye research* **85**: 626-636.
- Sun, N. K., Lu, H. P. & Chao, C. C. (2002).** Identification of rat DDB1, a putative DNA repair protein, and functional correlation with its damaged-DNA recognition activity. *J Biomed Sci* **9**: 371-380.
- Teruya, M., Takei, S., Forrest, L. E., Grunewald, A., Chan, E. K. & Charles, M. A. (1993).** Pancreatic islet function in nondiabetic and diabetic BB rats. *Diabetes* **42**: 1310-1317.
- Thorsby, E. & Ronningen, K. S. (1992).** Role of HLA genes in predisposition to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med* **24**: 523-531.
- Tisch, R. & McDevitt, H. (1996).** Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* **85**: 291-297.
- Tochino, Y. (1987).** The NOD mouse as a model of type I diabetes. *Crit Rev Immunol* **8**: 49-81.
- Todd, J. A., Aitman, T. J., Cornall, R. J., Ghosh, S., Hall, J. R., Hearne, C. M., Knight, A. M., Love, J. M., McAleer, M. A., Prins, J. B. & et al. (1991).** Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice. *Nature* **351**: 542-547.
- Tough, D. F., Borrow, P. & Sprent, J. (1996).** Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* **272**: 1947-1950.
- Ulloa, L. & Messmer, D. (2006).** High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine & growth factor reviews* **17**: 189-201.
- Vafiadis, P., Bennett, S. T., Todd, J. A., Nadeau, J., Grabs, R., Goodyer, C. G., Wickramasinghe, S., Colle, E. & Polychronakos, C. (1997).** Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* **15**: 289-292.
- Van Parijs, L. & Abbas, A. K. (1998).** Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science (New York, NY)* **280**: 243-248.
- Verge, C. F., Vardi, P., Babu, S., Bao, F., Erlich, H. A., Bugawan, T., Tiosano, D., Yu, L., Eisenbarth, G. S. & Fain, P. R. (1998).** Evidence for oligogenic inheritance of type 1 diabetes in a large Bedouin Arab family. *J Clin Invest* **102**: 1569-1575.
- Wedekind, D., Weiss, H., Jorns, A., Lenzen, S., Tiedge, M. & Hedrich, H. J. (2005).** Effects of polyinosinic-polycytidylic acid and adoptive transfer of immune cells in the Lew.1AR1-iddm rat and in its coisogenic LEW.1AR1 background strain. *Autoimmunity* **38**: 265-275.
- Weiss, H., Bleich, A., Hedrich, H. J., Kolsch, B., Elsner, M., Jörns, A., Lenzen, S., Tiedge, M. & Wedekind, D. (2005).** Genetic analysis of the LEW.1AR1-iddm rat: an animal model for spontaneous diabetes mellitus. *Mamm Genome* **16**: 432-441.
- Whalen, B. J., Greiner, D. L., Mordes, J. P. & Rossini, A. A. (1994).** Adoptive transfer of autoimmune diabetes mellitus to athymic rats: synergy of CD4+ and CD8+ T cells and prevention by RT6+ T cells. *J Autoimmun* **7**: 819-831.

- WHO (1965).** Diabetes mellitus. Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* **310**: 1-44.
- WHO (1990).** WHO Multinational Project for Childhood Diabetes. WHO Diamond Project Group. *Diabetes Care* **13**: 1062-1068.
- Wicker, L. S., Miller, B. J. & Mullen, Y. (1986).** Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* **35**: 855-860.
- Wicker, L. S., Todd, J. A. & Peterson, L. B. (1995).** Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* **13**: 179-200.
- Xystrakis, E., Dejean, A. S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D. & Saoudi, A. (2004).** Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* **104**: 3294-3301.
- Yagi, H., Matsumoto, M., Kunitomo, K., Kawaguchi, J., Makino, S. & Harada, M. (1992).** Analysis of the roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol* **22**: 2387-2393.
- Yokoi, N., Kanazawa, M., Kitada, K., Tanaka, A., Kanazawa, Y., Suda, S., Ito, H., Serikawa, T. & Komeda, K. (1997).** A non-MHC locus essential for autoimmune type I diabetes in the Komeda Diabetes-Prone rat. *J Clin Invest* **100**: 2015-2021.
- Yokoi, N., Komeda, K., Wang, H. Y., Yano, H., Kitada, K., Saitoh, Y., Seino, Y., Yasuda, K., Serikawa, T. & Seino, S. (2002).** Cblb is a major susceptibility gene for rat type 1 diabetes mellitus. *Nat Genet* **31**: 391-394.
- You, S., Slehoffer, G., Barriot, S., Bach, J. F. & Chatenoud, L. (2004).** Unique role of CD4⁺CD62L⁺ regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes in T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**: 14580-14585.
- Zhang, Z. L., Constantinou, D., Mandel, T. E. & Georgiou, H. M. (1994).** Lymphocyte subsets in thymus and peripheral lymphoid tissues of aging and diabetic NOD mice. *Autoimmunity* **17**: 41-48.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. & Shaw, J. (2001).** Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**: 782-787.
- Zipris, D., Hillebrands, J. L., Welsh, R. M., Rozing, J., Xie, J. X., Mordes, J. P., Greiner, D. L. & Rossini, A. A. (2003).** Infections that induce autoimmune diabetes in BBDR rats modulate CD4⁺CD25⁺ T cell populations. *J Immunol* **170**: 3592-3602.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Sigurd Lenzen und Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Hedrich danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und –materialien und die stets hilfreiche Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit sowie bei der Abfassung dieser Dissertation. Besonderer Dank gilt beiden für ihr außerordentliches Engagement im Laufe der Promotion und die vielen wertvollen Gespräche in dieser Zeit.

Herrn Prof. Hedrich danke ich zusätzlich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg und somit für die Möglichkeit dieser hervorragenden Ausbildung.

Herrn Prof. Lenzen danke ich außerdem für die Möglichkeit der interessanten Weiterbildung im Rahmen des EU-Projektes TONECA.

Bei Herrn Dr. Dirk Wedekind möchte ich mich für seine Motivation und sein Interesse an dem Thema, die grosse Hilfe bei der Planung und Durchführung der Versuche und seine stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Markus Tiedge danke ich für seine Hilfe bei der Bearbeitung der Manuskripte und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft für alle Belange der Arbeit – auch noch von Rostock aus.

Insbesondere danke ich Frau Prof. Dr. Anne Jörns, nicht nur für die Anfertigung und Überlassung der morphologischen Daten, sondern ebenso für ihre stete Hilfe bei jeglichen Problemen, ihre Motivation und ihr Engagement, mich zu unterstützen.

Weiterhin bedanke ich mich bei

Frau PD Dr. Marie-Luise Enss für die wundervolle Betreuung des Graduiertenkollegs. Der DFG danke ich für ihre Förder- und Sachmittel im Rahmen des GRK 705-II.

Den Mitarbeitern, Doktoranden und Gästen der Institute für Versuchstierkunde und Klinische Biochemie danke ich für ihre freundschaftliche Aufnahme und die ständige Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Sieglinde Egthessadi, Matthias Meyer, Sandra Pryzklenk und Ina Trotz aus dem Institut für Versuchstierkunde sowie Dagmar Lischke aus dem Institut für Klinische Biochemie.

Dr. Edwin Cuppen für die Gastfreundlichkeit beim Laboraufenthalt im Hubrecht Laboratorium, Utrecht/NL, die Einführung in die Techniken der Sequenzierung und die immer noch andauernde Kooperation zum Auffinden der Mutation.

Dipl.-Biol. Ortwin Naujok, für die nicht enden wollenden Fragen bezüglich der Formatierung, die ich ihm stellen durfte.

Dr. Nadine Held für die drei schönen gemeinsamen Jahre der Promotion.

Besonders bedanken möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung in der letzten Zeit.

DANKE!

8. Publikationsliste

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits veröffentlicht:

Weiss, H.; **Arndt, T.**; Tiedge, M.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Jörns, A.; Wedekind, D. (2005) Ein veränderter Anteil von peripheren CD3+ T-Lymphozyten diabetischer LEW.1AR1-*iddm* Ratten ist assoziiert mit einer Diabetessuszeptibilitätsregion auf RNO1. *Diabetes und Stoffwechsel* 14: Suppl 1, 34

Arndt, T.; Weiss, H.; Tiedge, M.; Jörns, A.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Wedekind, D. (2005) Immunologische Charakterisierung der LEW.1AR1-*iddm* Ratte. *Diabetes und Stoffwechsel* 14: Suppl 1, 123

Weiss, H.; **Arndt, T.**; Tiedge, M.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Jörns, A.; Wedekind, D. (2005) Immunogenetic characterisation of the LEW.1AR1-*iddm* rat. *Diabetologia* 48: [Suppl 1]: A193

Arndt, T.; Weiss, H.; Tiedge, M.; Jörns, A.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Wedekind, D. (2005) Functional characterisation of T-cells of the T1DM model LEW.1AR1-*iddm*. *Diabetologia* 48: [Suppl 1]: A80

Weiss, H.; **Arndt, T.**; Tiedge, M.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Jörns, A.; Wedekind, D. (2006) Immunogenetische Analysen der LEW.1AR1-*iddm* Ratte. *Diabetes und Stoffwechsel* 15: Suppl 1, 130

Arndt, T.; Weiss, H.; Tiedge, M.; Jörns, A.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Wedekind, D. (2006) T-Zellrepertoire und Zytokinexpressionsmuster der LEW.1AR1-*iddm* Ratte. *Diabetes und Stoffwechsel* 15: Suppl 1, 135

Arndt, T.; Weiss, H.; Elsner, M.; Jörns, A.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Wedekind, D. (2006) Characterisation of the T-cell repertoire in the LEW.1AR1-*iddm* rat. *Diabetologia* 49: [Suppl 1]: A16

Weiss, H.; **Arndt, T.**; Tiedge, M.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Jörns, A.; Wedekind, D. (2006) Immunogenetic characterisation of the LEW.1AR1-*iddm* rat. *Diabetologia* 49: [Suppl 1]: A451

Arndt, T.; Weiss, H.; Tiedge, M.; Jörns, A.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Wedekind, D. (2007) Nachweis von regulatorischem Potential innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten in LEW.1AR1-*iddm* Ratten, ein Tiermodell des T1DM. *Diabetes und Stoffwechsel* : Suppl

Arndt, T.; Jörns, A.; Weiss, H.; Tiedge, M.; Lenzen, S.; Hedrich, H.-J.; Wedekind, D. (2007) Autoaggressiveness and regulatory potential in the LEW.1AR1-*iddm* rat, an animal model of human T1DM. *Diabetologia* : [Suppl]:

Arndt, T.; Weiss, H.; Jörns, A.; Lenzen, S.; Cuppen, E.; Hedrich, H.-J.; Wedekind, D. (2008) Eingrenzung der Suszeptibilitätsregion *Iddm8* und Sequenzierung funktionell relevanter Kandidatengene in der LEW.1AR1-*iddm* Ratte, einem Tiermodell des humanen T1DM. *Diabetes und Stoffwechsel* : Suppl

[alles Abstract Veröffentlichungen]

Heike Weiss*^{1, 3}, **Tanja Arndt***^{1, 2}, Anne Jörns¹, Sigurd Lenzen¹, E.Cuppen⁴, Hans-Jürgen Hedrich², Markus Tiedge³ and Dirk Wedekind² (2008) The mutation of the LEW.1AR1-*iddm* rat maps to the telomeric end of RNO1. *Mamm Genome*. 2008 Apr;19(4):292-7. Epub 2008 Mar 21

Tagungen/Workshop

- 01.-04.Juli 2004 1. TONECA Symposium, Hannover, Deutschland
- 01.-03.April 2005 Insel Workshop, Goslar, Deutschland
- Präsentation
- 15.-16.April 2005 Rattenworkshop, Greifswald, Deutschland
- Präsentation
- 29.April.-01.Mai 2005 TONECA Focus Workshop (WP 3), Brighton, England
- Präsentation
- 04.-07.Mai 2005 40. Jahrestagung Deutsche Diabetes Gesellschaft, Berlin, Deutschland
- Poster
- 12.-15.September 2005 41. Jahrestagung EASD, Athen, Griechenland
- Präsentation
- 05.-09.Dezember 2005 TONECA Practical Workshop (WP 3), Leuven, Belgien
- 24.-27.Mai 2006 41. Jahrestagung Deutsche Diabetes Gesellschaft, Leipzig, Deutschland
- Poster
- 10.-12.September 2006 44. Wissenschaftliche Tagung GV-SOLAS, Freiburg, Deutschland
- Präsentation
 - Poster
- 14.-17.September 2006 42. Jahrestagung EASD, Kopenhagen, Dänemark
- Präsentation
- 16.-20. Oktober 2006 TONECA Practical Workshop (WP 2), Mailand, Italien
- 23.-25. November 2006 TONECA Focus Workshop (WP 2), Tübingen, Deutschland
- 16.-19. Mai 2007 42. Jahrestagung Deutsche Diabetes Gesellschaft, Hamburg, Deutschland
- Poster

- 17.-21. September 2007 43. Jahrestagung EASD, Amsterdam, Niederlande
- Poster
40. April-03. Mai 2008 43. Jahrestagung Deutsche Diabetes Gesellschaft, München
- Präsentation
- 04.-06. Mai 2008 TONECA Abschluss Symposium, Siena, Italien
- 07.-08. August 2008 Inselworkshop, Giessen, Deutschland
- 08.-11. August 2008 EASD/JDRF Meeting, Oxford, England
- 07.-11. September 2008 44. Jahrestagung EASD, Rom, Italien
- Poster

9. Lebenslauf

Name: Tanja Arndt
Adresse: Jägerpfad 7
31789 Hameln
Land: Deutschland
Geburtsdatum: 10. Januar 1979
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung: 1985-1989 Grundschule Wangelist, Hameln
1989-1991 Orientierungsstufe, Hameln
1991-1998 Schillergymnasium, Hameln
1998 Abitur
Okt. 1998-März 2003 Studium Dipl. Biologie, Leibniz Universität Hannover
Hauptfächer: Genetik, Mikrobiologie, Immunologie, Versuchstierkunde
April 2003-Feb. 2004 Diplom-Arbeit am Fraunhofer Institut, Hannover
Titel: „Neurothrophin Rezeptor Expression auf eosinophilen Granulozyten im allergischen Asthma Bronchiale“

Promotion: April 2004 Start des PhD-Programm an der Medizinischen Hochschule Hannover
Institut für Versuchstierkunde (Prof. H.-J. Hedrich)/ Institut für Klinische Biochemie (Prof. S. Lenzen)
Titel: „Immungenetische Analyse der LEW.1AR1-*iddm* Ratte – Ein Tiermodell des humanen Typ 1 Diabetes Mellitus“
Förderung: Stipendium des Graduiertenkollegs 705.2 (DFG)

10. Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und unter der Angabe aller Hilfsmittel verfasst habe. Die vorliegende Dissertation ist nicht als Diplomarbeit oder vergleichbare Arbeit verwendet worden.

Hannover, 19. Juni 2008

Tanja Arndt