

**UNTERSUCHUNGEN ZUR MODULATION DER  
PRÄDIABETISCHEN INSELENTZÜNDUNG IM  
TIERMODELL DER NOD-MAUS**

**MELANIE AN HAACK**



**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Deutschen Diabetes-Zentrum  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Betreuer: Prof. Dr. Hubert Kolb

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

---

# **Untersuchungen zur Modulation der prädiabetischen Inselentzündung im Tiermodell der NOD-Maus**

---

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**MELANIE AN HAACK**

Tierärztin aus Oberhausen  
(Nordrhein-Westfalen)

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hubert Kolb

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli 2007

## **I. INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1	Der Diabetes mellitus Typ 1	4
1.2	Das Tiermodell NOD-Maus	6
1.3	Cyclophosphamid	8
1.4	Zytokine	9
1.5	Th1/Th2-Konzept	11
1.6	Die diabetische Inselentzündung	13
1.7	Das Darmimmunsystem und die „orale Toleranz“	14
1.8	Der IDDM und das Darmimmunsystem	15
1.9	DNA-Vakzinierung	17
1.10	Hitzeschockprotein 60	19
1.11	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1	21
1.12	Arbeitshypothese und Versuchsmodell	22
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Tiere und Haltungsbedingungen	24
2.1.2	Reagenzien	24
2.1.3	Verbrauchsmaterial	25
2.1.4	Geräte	26
2.1.5	Stammlösungen, Medien, Puffer	27
2.1.6	Agarosegele	28
2.1.7	Färbelösung	28
2.1.8	Medien für Bakterienkulturen	28
2.1.9	Enzyme	29
2.1.10	DNA-Oligonukleotide für die RT-PCR	29
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Analyse der Zytokingenexpression im Darmimmunsystem während der Cyclophosphamid-induzierten Krankheitsentwicklung</b>	<b>31</b>
2.2.1.1	Versuchsdurchführung	31
2.2.1.2	Zeitschema der Versuchsdurchführung	31
2.2.1.3	RNA-Isolation aus dem Dünndarm von NOD/Bom-Mäusen	32
2.2.1.4	Spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	32
2.2.1.5	RNA-Gelelektrophorese	33
2.2.1.6	Reverse Transkription	33
2.2.1.7	Polymerase Chain Reaction (PCR)	34
2.2.1.8	DNA-Gelelektrophorese	36
2.2.1.9	Quantifizierung der PCR-Produkte	36

<b>2.2.2</b>	<b>Orale Vakzinierung mit Plasmid-DNA</b>	<b>37</b>
2.2.2.1	Flussdiagramm „Methoden zur Klonierungstechnik“	38
2.2.2.2	Insert-DNA	39
2.2.2.3	Plasmidkarten der Vektoren	40
2.2.2.4	Transformation von Plasmid-DNA in TOP 10F <sup>®</sup> -Bakterienzellen	41
2.2.2.5	Kultivierung der TOP 10F <sup>®</sup> -Bakterienzellen	42
2.2.2.6	Mini-DNA-Aufreinigung zur präparativen pDNA-Isolierung	42
2.2.2.7	Mega-DNA-Aufreinigung zur präparativen pDNA-Isolierung	43
2.2.2.8	Restriktionsverdau von pDNA	43
2.2.2.9	DNA-Gelelektrophorese	43
2.2.2.10	Eluieren von DNA aus einem Agarosegel	44
2.2.2.11	Ligation von DNA	44
2.2.2.12	Sequenzierung	45
2.2.2.13	Versuchsdurchführung	45
2.2.2.14	Zeitschema der Versuchsdurchführung	46
2.2.2.15	Tiersektion und Materialaufbereitung	47
2.2.2.16	Anfertigung von histologischen Gefrierschnitten	47
2.2.2.17	Hämatoxylin-Eosin-Färbetechnik	48
2.2.2.18	Auswertung der Langerhans-Inseln und Bestimmung des Insulitisgrades	48
2.2.2.19	Subgraduierung der Inseln vom Grad 4	49
2.2.2.20	Immunhistologie und Insulinfärbung	49
2.2.2.21	Auswertung der insulinpositiven Fläche der Langerhans-Inseln	51
2.2.2.22	Statistik	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Analyse des Cyclophosphamid-Modells</b>	<b>52</b>
3.1.1	Charakterisierung der Inselentzündung bei NOD-Mäusen	52
3.1.2	Progression der Insulitis im Cyclophosphamid-synchronisierten Modell der NOD-Maus	56
3.1.3	Charakterisierung der Insulin-positiven Inselzellen	58
3.1.4	Einfluss von Cyclophosphamid auf die Insulinexpression in den Langerhans-Inseln bei NOD-Mäusen	59
<b>3.2</b>	<b>Zytokingenexpression im Darmimmunsystem während der Cyclophosphamid-induzierten Krankheitsentwicklung</b>	<b>60</b>
3.2.1	mRNA-Analyse von IFN- $\gamma$	60
3.2.2	mRNA-Analyse von TNF- $\alpha$	61
3.2.3	mRNA-Analyse von TGF- $\beta$	62
3.2.4	mRNA-Analyse von IL-10	64
3.2.5	Änderung der IL-10-Expression und TGF- $\beta$ -Expression unter Cyclophosphamid-Behandlung	65

<b>3.3</b>	<b>Orale Vakzinierung von NOD-Mäusen mit Plasmid-DNA-Konstrukten</b>	<b>67</b>
3.3.1	Modulation des Infiltrationsgeschehen durch orale DNA-Vakzine	67
3.3.2	Subgraduierung der Langerhans-Inseln vom Grad 4	70
3.3.3	Immunhistochemische Analyse der Insulinproduktivität	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Effekt des Cyclophosphamid</b>	<b>75</b>
4.1.1	Einfluß auf das Entzündungsgeschehen	75
4.1.2	Synchronisation des Krankheitsverlaufs	76
<b>4.2</b>	<b>Analyse der Zytokingenexpression im Darmimmunsystem während der Cyclophosphamid-induzierten Krankheitsentwicklung</b>	<b>78</b>
<b>4.3</b>	<b>Modulation der Insulitis durch orale Vakzinierung mit Plasmid-DNA-Konstrukten</b>	<b>80</b>
4.3.1	Applikation und Expression der pDNA-Konstrukte	80
4.3.2	Vakzinierung mit pDNA-Konstrukten	81
4.3.3	Immunhistochemische Analyse der Insulinproduktivität in den Langerhans-Inseln von NOD-Mäusen	83
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>99</b>
8.1	Abkürzungen	99
8.2	Danksagung	102

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Der Diabetes mellitus Typ 1**

Der Diabetes mellitus Typ 1, oder früher auch Insulin-dependent Diabetes Mellitus (IDDM), ist eine multifaktorielle Erkrankung. Eine weitgehend selektive Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas bedingt einen absoluten Insulinmangel. Man spricht daher auch von einem insulinpflichtigen Diabetes oder Insulinmangeldiabetes .

Die direkte Ursache für den Untergang der  $\beta$ -Zellen ist eine chronisch-progressive Inselentzündung. Der  $\beta$ -Zelluntergang erfolgt während einer langsam fortschreitenden Infiltration der Inseln mit mononukleären Zellen. Hierbei kommt es zu einem chronischen Entzündungsgeschehen (Insulitis) und die  $\beta$ -Zellen gehen zugrunde. Als Folge dessen stagniert die Synthese des Insulin allmählich [1]. Zunächst ist die Erkrankung durch eine latente, sog. prädiabetische Phase charakterisiert. Erst nachdem 80 - 90 % der  $\beta$ -Zellen zerstört oder funktionell inaktiv sind, manifestiert sich ein Insulinmangelsyndrom. Die fortschreitende Erschöpfung der körpereigenen Insulinsekretion führt zu einem klinischen Erscheinungsbild, welches u.a. durch einen absoluten Insulinmangel und durch Stoffwechsellentgleisungen charakterisiert ist. Dem Insulinmangel kann nur durch eine Insulin-Substitutionstherapie entgegen gewirkt werden [1, 2].

Die klinischen Symptome sind Entgleisungen des Kohlenhydratstoffwechsel, die mit Hyperglykämie, Polyurie, Polydypsie und Ketoazidose einhergehen. Die Ketoazidose kann bis zum Koma diabeticum führen. Zu den sekundären Folgeerscheinungen zählen Retinopathien, Nephropathien, Früharteriosklerose und Neuropathien.

Als kausale Ursachen für die Entstehung der Erkrankung werden sowohl exogene als auch endogene Faktoren verantwortlich gemacht. Zu den exogenen Faktoren zählen Umwelteinflüsse, Stress, Infektionen, Toxine und auch diätetische Aspekte der Nahrungsmittelaufnahme [1, 3, 23].

Eine genetische Prädisposition ist als endogener Faktor von pathogenetischer Bedeutung. Die HLA-D-Region wird neben anderen, noch nicht eindeutig

identifizierten Genloci, mit einem erhöhten Diabetesrisiko in Zusammenhang gebracht [7].

Zahlreiche Studien belegen, dass Immunreaktionen bei der  $\beta$ -Zelldestruktion von Bedeutung sind [3]. Immunhistochemische Untersuchungen konnten alle wesentlichen Immunzelltypen in den entzündeten Inselzellen des Pankreas nachweisen. Besonders T-Lymphozyten und Makrophagen sind vertreten [7].

Der initiale Auslöser für die Zerstörung der Inselzellen durch Immunzellen ist noch nicht hinreichend identifiziert. Wesentlich ist jedoch, dass durch die genannten exogenen und endogenen Faktoren eine Autoreaktivität von T-Lymphozyten gefördert wird. Hierzu zählen zum einen die zytotoxischen T-Zellen oder auch  $CD8^+$ -Zellen. Die T-Helferzellen (Th-Zellen) oder  $CD4^+$ -Zellen bestimmen zelluläre (Th1) und humorale (Th2) Immunantworten. Die Unterscheidung erfolgt aufgrund von einem spezifischen Zytokinsekretionsmuster. Th1-Zellen sezernieren z.B.  $IFN-\gamma$ , Th2-Zellen z.B. IL-4 und IL-10 [2].

Im Rahmen des immunologischen Krankheitsgeschehens lassen sich Autoantikörper im Serum von Typ 1 Patienten nachweisen. Sie gelten somit als Marker für den humanen IDDM. Untersuchungen im Tiermodell haben jedoch ergeben, dass sie wahrscheinlich keine Rolle in der Pathogenese spielen [4]. Dafür spricht auch die kürzliche Beschreibung vom Typ 1 Diabetes bei einem Jugendlichen mit defekter B-Lymphozytenentwicklung [97].

Zu den wichtigsten Autoantikörpern zählen Inselzellantikörper (ICA, islet cell antibody), Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) und Insulinautoantikörper (IAA) [98].

Die ICA gehören zu verschiedenen Antikörperspezies der IgG-Klasse. Die Hauptpopulation bindet an die Mehrzahl der Inselzellen des Pankreas. Antikörper gegen Rinderserumalbumin weisen eine gewisse Kreuzreaktivität mit dem Inselantigen „ICA 69“ auf. Antikörper gegen GAD sind ein Subtyp der Antikörper gegen eine 64 kD schwere Inselzellproteinfraktion („64-kD-Antigen“). Die IAA sind bereits vor der Manifestation des IDDM nachweisbar [7].

Im Tiermodell der non obese diabetic (NOD) mouse konnten geringe Titer von anti-Insulin-, anti-GAD- und auch von anti-Heat Shock Protein (Hsp)60-Antikörpern nachgewiesen werden [98].

Zahlreiche Therapieansätze beschäftigen sich mit der Modulation der immunologischen Pathomechanismen des Typ 1 Diabetes. Ziel ist es, die Progression bzw. Manifestation eines IDDM zu verzögern oder bestenfalls zu verhindern. Eine Früherkennung der Erkrankung ist essentiell für eine erfolgreiche Interventionstherapie.

## **1.2 Das Tiermodell NOD-Maus**

Die heutigen Erkenntnisse zur Pathogenese des IDDM basieren zu einem wichtigen Teil auf Untersuchungen, die im Tiermodell mit NOD-Mäusen und Bio Breeding-(BB)Ratten gewonnen wurden [5, 6]. Die NOD-Maus stellt das meistgenutzte Tiermodell des Typ 1 Diabetes dar. Sie stammt aus einer Inzuchtlinie und wurde 1974 erstmals in Japan entdeckt und gezüchtet. Sie entstand zufällig aus einer Auszuchtlinie, die ursprünglich auf die Entstehung eines Katarakt hin selektiert wurde. Erstes Resultat dieser Auszucht war eine Mauslinie ohne Katarakt, aber mit rapide steigenden Blutglukosespiegeln.

Die eigentliche NOD-Linie entwickelte sich durch Zufall aus einer fortgeführten Co-Selektion von Kontrolltieren, die normoglykämische Blutparameter aufwiesen.

In der 20. Generation traten dann spontane Fälle eines Typ 1 Diabetes auf und weitere Kreuzungen erbrachten, dass hinsichtlich des genetischen Hintergrundes eine homozygote Expression der NOD Major Histocompatibility Complex (MHC)-Klasse II-Allele essentiell für eine Krankheitsentwicklung sind [5, 6].

Das Immunsystem unterscheidet Eigen- und Fremdartigene an spezifischen Zelloberflächenstrukturen. Eine Gruppe von solchen Zelloberflächenproteinen wird durch einen Komplex von Genen kodiert, dem MHC-Komplex. Bei der Maus ist der MHC auf Chromosom 17 lokalisiert. Es befinden sich aber auf fast allen Chromosomen MHC-Gene [21, 46].

Die NOD-Mäuse entwickeln einen spontanen IDDM, welcher aus einer Einwanderung von mononukleären Immunzellen in die pankreatischen Inseln und

einer sich allmählich entwickelnden Inselentzündung entsteht. Eine selektive  $\beta$ -Zellerstörung bewirkt letztendlich einen Insulinmangel und eine daraus resultierende Hyperglykämie und Glukosurie. Die Entwicklung eines klinisch manifesten Diabetes variiert alters- und geschlechtsspezifisch. Der Grund, warum es nicht bei allen Tieren gleichermaßen zu einer Zerstörung der Langerhans-Inseln kommt, ist nicht eindeutig geklärt [8, 3, 9].

Die prädisponierenden Gene für den Diabetes sind innerhalb und ausserhalb der MHC-Region lokalisiert. Es wurden 18 Genloci auf 11 verschiedenen Chromosomen identifiziert, die mit dem Diabetes bzw. der Insulitis in Zusammenhang gebracht werden. Kreuzungsversuche zwischen NOD und nicht-diabetischen Mäusen deuten auf eine rezessive Vererblichkeit der Gene hin.

Der stärkste Suszeptibilitätslocus auf Chromosom 17 ist MHC-assoziiert. Der suszeptible *idd-1*-Locus wird zur MHC-Klasse II-Region gezählt. Der *idd-7*-Locus wird als Resistenz-Locus beschrieben [8].

Die spontane Insulitisentwicklung beginnt nach 4 - 6 Wochen. Exogene Einflüsse, wie z.B. Umweltbedingungen, Ernährung, Stress, Infektionen modulieren das Erkrankungsrisiko und den Erkrankungszeitpunkt [7, 23].

Die massive Infiltration beginnt ab einem Alter von 4 - 8 Wochen und äussert sich bei beiden Geschlechtern. Die Phase der Manifestation liegt zwischen 80 und 200 Tagen und schliesst sich der prädiabetischen Phase an. Die Diabetesrate beträgt bei den weiblichen NODs 60 - 80 %, bei den männlichen Tieren in der Regel nur ca. 10 - 20 % [6].

Das Krankheitsbild der NOD-Maus ähnelt sehr stark dem des Menschen. Die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse zur Ätiopathogenese des IDDM bilden die Grundlage zur Erforschung der Erkrankung und Entwicklung von Therapieansätzen. Es können zwar nicht alle gewonnenen Erkenntnisse beim Nagetier auf den Menschen übertragen werden, dennoch können neue Behandlungsansätze getestet werden. Ausserdem ermöglicht das Tiermodell die Verfügbarkeit von Pankreasgewebe in allen Krankheitsphasen. Die Möglichkeit, durch vereinheitlichte Umweltbedingungen den Einfluss exogener Faktoren auf die Krankheitsentwicklung zu untersuchen, stellt einen weiteren entscheidenden Vorteil dar [8].

### 1.3 Cyclophosphamid

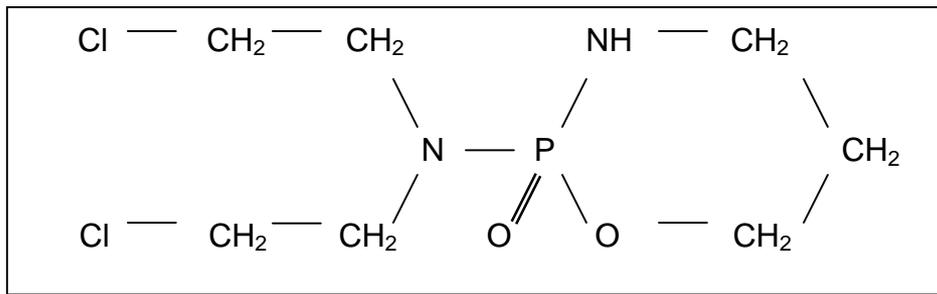


Abb.1: Strukturformel CYCLOPHOSPHAMID

Das Alkylanz Cyclophosphamid zählt zu der Wirkstoffgruppe der Zytostatika [13].

Es ist bekannt, dass bereits die einmalige Injektion von Cyclophosphamid zur Beschleunigung und Synchronisation eines klinischen Typ 1 Diabetes im NOD-Tiermodell führt [10, 11, 12, 14].

Das Cyclophosphamid induziert eine massive Infiltration der Langerhans-Inseln mit Immunzellen. Histologisch sind T-Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie Makrophagen und Dendritische Zellen (DZ), zu finden. Diese Induktion ist geschlechtsunabhängig, d.h. sie tritt, im Gegensatz zum spontanen Krankheitsverlauf, bei weiblichen und männlichen NODs gleichermaßen in Erscheinung [15].

Bereits wenige Tage nach Applikation (250 mg/kg, intraperitoneal) kann eine Progression von einer milden Th2-assoziierten (Peri-)Insulitis zu einer destruktiven Intransulitis beobachtet werden. Die aktivierten Makrophagen und anderen APZ sezernieren vermehrt die Th1-assoziierten Zytokine IL-12, IL-18 und IFN- $\gamma$ . Der Übergang von einer benignen zu einer destruktiven Insulitis ist also von einem Shift von Th2 zu Th1 begleitet [16,17].

Der genaue Wirkmechanismus des Cyclophosphamid ist nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass die Intensität einer Immunantwort durch Hemmung der Funktion von T-Suppressor-Zellen gesteigert wird [6,15,13]. Auch wird postuliert, dass eine Aktivierung von Makrophagen und anderen APZ zu einer Induktion einer Th1-Antwort führt [18].

## 1.4 Zytokine

Zytokine sind Proteine oder Peptide, die primär als immunregulatorische Signalsubstanzen zwischen den Zellen im Verlauf von Immunantworten fungieren. Interaktion und Kommunikation zwischen den Geweben und Zellen sind eine wichtige Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des Organismus. Besonders das Immunsystem muss zur Erfüllung seiner Aufgaben, der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ sowie der Abwehr pathogener Mikroorganismen überall gegenwärtig sein. Hierzu stellt es ein mobiles, über den gesamten Organismus verteiltes System mit mobilen, weissen Blutzellen zur Verfügung [20, 21]. Die Kommunikation dieser Zellen untereinander und der Kontakt zu anderen Zielzellen erfolgt mittels sezernierter Signalsubstanzen, den Zytokinen. Sie entfalten zum einen eine lokale Wirkung durch interzelluläre Kontakte, zum anderen bewirken sie systemische Reaktionen im Immun- und Entzündungsgeschehen [19, 20, 21, 22].

Die Botschaft der Zytokine wird über einen speziellen Rezeptor auf der Zelloberfläche der Zielzellen vermittelt und die regulatorische Funktion entfaltet sich bereits in sehr geringen Wirkdosen. Das Wirkschema der Zytokine ist äusserst komplex. So können mehrere Zytokine von einer Zelle synthetisiert werden, wiederum kann ein einzelnes Zytokin seine Wirkung auf mehrere Zellen oder Zellstrukturen (pleiotroper Effekt) ausüben. Auch kann eine Induktion durch Selbststimulation stattfinden [21, 78]. Der grösste Teil der Zytokine diffundiert nach der Sekretion in die nähere Umgebung. Es wird entweder die Funktion der sezernierenden Zellen selbst (autokriner Effekt) oder anderer Zellen (parakriner Effekt) beeinflusst [21].

Die Zytokine lassen sich nach Struktur- und Funktionsmerkmalen in einzelne Kategorien zusammenfassen. Man unterscheidet Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Wachstumsfaktoren (TGF) und Kolonie-stimulierenden-Faktoren (CSF), wobei im Rahmen dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf die vier Erstgenannten gerichtet sein soll.

IFN haben ein breites biologisches Wirkungsspektrum. Hierzu zählen antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Aufgaben. IFN werden sehr früh im Laufe

einer Infektion gebildet. Man unterscheidet drei Familien: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ . Die immunmodulatorische Wirkung betrifft besonders das IFN- $\gamma$ . IL-12 induziert die Bildung von IFN- $\gamma$  durch die natürlichen Killerzellen (NK). IFN- $\gamma$  wiederum aktiviert Makrophagen und stimuliert diese zur Bildung von IL-12 [25, 94]. Auch T-Lymphozyten sind zur Bildung von IFN- $\gamma$  fähig. IFN- $\gamma$  steigert die Aktivität von Monozyten und anderen APZ. Ausserdem induziert es die Bildung von MHC-Klasse II-Antigenen auf APZ und verschiedenen Geweben [21]. IFN- $\gamma$  ist ein wichtiger Vertreter der Th1-Zytokine und wirkt gleichzeitig inhibierend auf Th2-Immunantworten [94, 95].

Interleukine stellen eine grosse Gruppe der Zytokine dar. Der Begriff der „Interleukine“ wurde 1979 geprägt und bedeutet ursprünglich „zwischen Leukozyten etwas bewegen“ [24].

Sie werden hauptsächlich von T-Zellen (Lymphozyten) produziert, aber auch von mononukleären Phagozyten und Gewebszellen. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, andere Zellen bei der Teilung und Differenzierung zu steuern.

IL-10 wird als Zytokinsynthese-Inhibitionsfaktor beschrieben und unterstützt antiinflammatorische Reaktionen [26]. Das IL-10 wird von Th-2 assoziierten Immunzellen und APZ synthetisiert. IL-10 blockiert die Effektorfunktionen von Makrophagen, die Th1-induzierte Entzündungsreaktionen unterstützen. IL-10 wird auch als natürliches „Anti-Th1“-Zytokin beschrieben [25].

Für das IL-10 konnten sowohl immunstimulatorische, als auch immuninhibierende Effekte gezeigt werden. Es wirkt inhibierend auf die Zytokinproduktion von Th1-Zellen [27], bei gleichzeitiger Förderung der Th2-Zelldifferenzierung. Desweiteren hemmt es die Induktion des Enzym iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) in Makrophagen. [28, 29, 30]

1975 führten Experimente zur Entdeckung eines antitumoral wirkenden Faktors, den „Tumor-Nekrose-Faktor“. Die Bedeutung des TNF- $\alpha$  innerhalb des Immunsystems ist aber weniger diese antitumorale Wirkung als die zentrale regulatorischen Funktionen bei Entzündungen und Immunreaktionen. TNF ist ein wichtiger Entzündungsmediator und spielt bei der Infektionsabwehr eine Rolle. TNF- $\alpha$  wird vorwiegend von aktivierten Monozyten und anderen Makrophagen gebildet. Es bindet an auf zahlreichen Zellen vorhandenen, spezifischen Rezeptoren und induziert primär

entzündliche Reaktionen [21]. TNF- $\alpha$  stimuliert die IL-1-Synthese bei Makrophagen einschließlich Monozyten. Zusammen mit IL-1 ist es ein Auslösesignal für die INF- $\gamma$ -induzierte Makrophagenaktivierung [26, 23]. Weiter unterstützt es die Aktivierung von antigenstimulierten T-Zellen und die Regulation der Antikörperproduktion. Wichtig ist TNF- $\alpha$  bei der Induktion weiterer Zytokine, wie z.B. IL-6, koloniestimulierende Faktoren, Prostaglandin E<sub>2</sub> und Kollagenase [24].

Der "Transforming Growth Factor"- $\beta$  ist multifunktional. Er hat sowohl stimulierende, als auch inhibierende Eigenschaften bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen. TGF- $\beta$  hemmt die Proliferation von T- und B-Zellen, das Ausreifen von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen. Es hemmt die Aktivierung von Makrophagen und die Wirkung der entzündungsfördernden Zytokine. TGF- $\beta$  ist ein Antagonist von IL-2 [23, 21]. TGF- $\beta$  zählt zu den antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen und wird einer Th2-Immunantwort zugeordnet [26].

### 1.5 Th1/Th2-Konzept

Die T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer spezifischen Oberflächenstrukturen in CD4<sup>+</sup> (T-Helferzellen) und in CD8<sup>+</sup> (zytotoxische T-Zellen) unterschieden.

Erstmals klassifizierte Mosmann 1986 die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen in zwei Gruppen [31]. Er unterschied in Abhängigkeit von einem spezifischen Zytokinsekretionsmuster in Th1- und Th2-Zelltypen. Th1-assoziierte Zytokine werden der zellulären Immunantwort zugeordnet und als proinflammatorisch beschrieben. Zu ihnen zählen z.B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2.

Th2-Zytokine vermitteln die humorale Immunantwort und gelten als protektiv im Entzündungsgeschehen. Zu ihnen zählen z.B. IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 [20, 25].

Ursprünglich naive CD4<sup>+</sup>-Zellen differenzieren sich nach Kontakt mit einem ersten Stimulus, den Antigen-präsentierenden Zellen, in Th0-Zellen. Dieses Th0-Stadium ist das Vorläuferstadium zur gerichteten Entwicklung in Th1- oder Th2-Zellen. Es werden geringe Mengen an IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  sezerniert.

Den grössten Einfluss auf die gerichtete Differenzierung in Th1- bzw. Th2-Zellen hat das umliegende Zytokinmilieu, die Anwesenheit bestimmter Antigene und der Typ der APZ (Makrophagen, DZ) [25].

Die vermehrte Synthese von IL-12 durch aktivierte Makrophagen und DZ bewirkt eine Th1-gerichtete Differenzierung, da die Sekretion von IL-12, z.B. bei einer Infektion, wiederum die Bildung von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen und T-Zellen induziert. IFN- $\gamma$  begünstigt die IL-12-Synthese. Die beiden Zytokine verhalten sich synergistisch zueinander.

Eine Entwicklung in Th2-Richtung wird durch die erhöhte Produktion von IL-4 induziert. Dieses wird v.a. von NK-Zellen und T-Zellen sezerniert. Die Th2-Zellen sezernieren neben IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 auch weiteres IL-4. Es kommt zu einer positiven Rückkopplung [25].

Die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen sind in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen von Bedeutung. So werden immunassoziierte Krankheitsbilder aufgrund ihres Zytokinexpressionsmusters neu interpretiert. Die Multiple Sklerose oder die Rheumatoide Arthritis werden eher einer krankheitsauslösenden Th1-Antwort zugeordnet. Viele allergische Reaktionen oder die Atopische Dermatitis werden zu einer Th2-Antwort gezählt [32].

Das Wissen um diese Unterscheidungsmöglichkeit eröffnet neue Ansätze zur Erforschung und Therapie von immunmedierten Erkrankungen.

Der Typ 1 Diabetes kann einer Th1-medierten Immunantwort zugeordnet werden. Man geht davon aus, dass die  $\beta$ -Zelldestruktion durch eine vermehrte Aktivierung von Th1-Zellen zustande kommt. Die von T-Helferzellen sezernierten Zytokine beeinflussen die Diabetesentwicklung. In-vivo Studien zeigen diese Beeinflussbarkeit der Th1-/Th2-Balance und die mit einem Th2-Shift verbundene Hemmung einer Insulitis- und Diabetesentwicklung [19, 33, 34, 35, 36]. Durch systemische IL-10-Gaben konnte bei NOD-Mäusen sowohl die Insulitis, als auch die Diabetesprogression gehemmt werden [37].

Beim Cyclophosphamid-induzierten Diabetes der NOD-Maus konnte 10 Tage nach Applikation eine gesteigerte Makrophagenaktivität einhergehend mit einer gesteigerten iNOS-Expression beobachtet werden. Gleichzeitig zeigten sich erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel und die Entstehung einer destruktiven Insulitis [11].

Die Wirkmechanismen von Th1 und Th2 verhalten sich antagonistisch. Dabei kommt es zu einer Hemmung des anderen Zelltyps oder zu einer Hemmung der

Effektorfunktion. Das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  wirkt z.B. IL-4-medierte Effekten entgegen. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 hemmen Effektorfunktionen von IFN- $\gamma$  auf der Ebene von IL-1 und TNF- $\alpha$  [38].

## 1.6 Die diabetische Inselentzündung

Die Einwanderung von mononukleären Zellen in die insulinproduzierenden Inseln des Pankreas bewirken ein Entzündungsgeschehen, welches als Insulitis bezeichnet wird.

Im NOD-Tiermodell entwickeln annähernd 100% der Tiere eine Insulitis. Bei den männlichen Tieren kommt es doch meist nur in 10 - 20% der Fälle tatsächlich zu einer spontanen Diabetesmanifestation [17]. Dies suggeriert, dass es sich bei der Insulitis zunächst um eine nicht destruktive lokale Entzündung handelt. Die eigentliche Zerstörung der  $\beta$ -Zellen erfolgt erst in einer späten Phase der Inselentzündung [16]. Die Insulitis kann dennoch in zwei Phasen untergliedert werden, in eine „benigne“ und eine „destruktive“ Form [17].

Bei den ersten infiltrierenden Immunzellen handelt es sich um APZ, d.h. Makrophagen und Dendritische Zellen. Im weiteren Verlauf der Inselentzündung findet man auch T-Lymphozyten und schließlich B-Lymphozyten [12, 39].

Von einer „benignen“ Form spricht man bei der sogenannten Th2-Insulitis. Es dominieren Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  [41]. Man findet diese frühe, nicht destruktive Form während der prädiabetischen Phase. Die infiltrierenden Zellen führen nicht unbedingt zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen und lokalisieren sich im histologischen Bild im Randbereich der Langerhans-Inseln.

Im fortschreitenden Krankheitsverlauf kommt es zu einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen, Dendritischen Zellen und T-Lymphozyten aus der Inselperipherie in die Inseln. Die vermehrte Aktivierung von Th1-Zellen bedingt einen Shift von Th2 zu Th1. Die APZ sezernieren die Zytokine IL-12 und IL-18. Diese fördern die vermehrte Synthese von Entzündungsmediatoren wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Charakterisiert ist dieses Stadium durch eine „destruktive“ Intransulitis. Die Zellinfiltrate lokalisieren sich im gesamten Inselareal und die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen werden zerstört [18,17].

Der genaue Mechanismus, wann und wie es zum  $\beta$ -Zelltod kommt, ist noch nicht eindeutig charakterisiert [16, 40]. Auch der initiale Stimulus, der die APZ in das exokrine Gewebe einwandern lässt, ist unbekannt [44].

Die Th1-/Th2-Balance im Rahmen der diabetischen Inselentzündung stellt die Grundlage für Präventivversuche dar, die Zerstörung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen mittels immunmodulatorischer Maßnahmen zu beeinflussen. Interventionsstudien beschäftigen sich mit der Stimulation oder Administration von protektiven Th2-Zytokinen oder der Hemmung der Th1-Reaktivität [12, 14, 36, 44].

### **1.7 Das Darmimmunsystem und die „orale Toleranz“**

Eine lokale Auseinandersetzung der Nahrungskomponenten mit dem Immunsystem erfolgt im Darm. Das darmeigene lymphoepitheliale Gewebe (GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue) ist ein immunologisch komplex entwickeltes System [45].

Hier befindet sich eine der grössten Ansammlungen von immunkompetenten Zellen, zu denen diffus in der Mukosa und in der Lamina Propria verteilte Lymphozyten gehören. Aggregationen von Lymphknötchen, die Peyer-Plaques, liegen in der Submukosa in den Dünndarmabschnitten v.a. des Ileum.

Die Zellen des lymphoepithelialen Gewebes ermöglichen eine direkte Unterscheidung zwischen schädlichen, infektiösen und unschädlichen Antigenen. Mikrobielle Antigene pathogener Organismen werden erkannt und bekämpft. Die physiologische Darmflora und essentielle Nahrungsbestandteile hingegen werden als unschädlich identifiziert [46].

Diese, als „orale Toleranz“ bezeichnete Fähigkeit des Immunsystems ermöglicht eine Immunantwort gegen ein oral, d.h. über den Darm aufgenommenes Antigen zu vermeiden [45, 65]. Eine Fehlfunktion würde dazu führen, dass aufgenommene Nahrungsmittelantigene allergische Reaktionen und die darmeigene Mikroflora massive Immunantworten und Entzündungsreaktionen auslösen könnten [47].

Bei der Aufklärung des Mechanismus, dem die orale Toleranz unterliegt, wurde festgestellt, dass die Dosis der aufgenommenen Antigene eine entscheidende Rolle spielt. Es werden zwei Mechanismen unterschieden. Zum einen eine aktive Modulation der Immunantwort und zum anderen eine Inaktivierung der Lymphozyten [49].

Niedrige Dosen von oralen Antigenen induzieren die Synthese von suppressiven Zytokinen wie TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-10 durch T-Lymphozyten [45]. Der Mechanismus gründet auf einer „aktiven Suppression“ durch T-Zellpopulationen [47].

TGF- $\beta$ -produzierende T-Zellen sind die Hauptmediatoren. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 werden als die beiden primären antiinflammatorisch wirkenden Zytokine des Darmimmunsystems besprochen [50]. Es existieren dennoch kontroverse Meinungen, wie groß die tatsächliche Bedeutung dieser beiden Zytokine für die „orale Toleranz“ ist [47].

Bei höheren Dosen kommt es eher zu einer Inaktivität der Zellen. Man spricht vom Mechanismus der T-Zell-Anergie. Die Antigenpräsentation löst keine Immunantwort aus, da induzierende inflammatorische Moleküle fehlen [47, 49].

Ein weiterer Effektor der oralen Toleranz ist der Untergang von antigenspezifischen Zellpopulationen. Man spricht auch vom „programmierten Zelltod“ oder Apoptose. Hohe orale Dosen bewirken entweder ein Fehlen von Antigen-reaktiven T-Zellen oder deren Zelltod [47].

## 1.8 Der IDDM und das Darmimmunsystem

Diverse Untersuchungen zeigen, dass das Darmimmunsystem in nicht unerheblichem Umfang in die Pathogenese des Typ 1 Diabetes involviert ist. Diätetische Manipulationen hatten im Tiermodell sowohl fördernde als auch hemmende Effekte auf die Krankheitsentstehung [51]. Die oral aufgenommenen Nahrungsmittelantigene, speziell die Proteinfractionen, spielen als exogene, diabetogene Faktoren in der Ätiopathogenese des IDDM eine besondere Rolle [8, 48].

1984 beschrieben *Elliott et al.* als erste den Zusammenhang zwischen Nahrungsmittelantigenen, dem Darmimmunsystem und Entstehung eines

autoimmunen IDDM. Es konnte die Diabetesrate bei NOD-Mäusen und bei BB-Wistar-Ratten, einem weiteren Tiermodell für den IDDM, durch semisynthetische Diäten vermindert werden [52]. Eine spezielle Kombinationsdiät mit einem kaseinfreien Sojaprotein (Prosobee) und zusätzlichen Gaben von 1% Nikotinamid im Trinkwasser konnte bei jungen NOD-Mäusen die Diabetesinzidenz stark senken und der Entstehung einer massiven Insulitis vorbeugen [53].

Kuhmilch wird als möglicher diabetogener Ernährungsfaktor diskutiert [46, 54, 55]. Bei Typ 1 Diabetes-Patienten wurde eine gesteigerte Immunreaktivität gegen Kuhmilchproteine, z.B. Bovines Serum Albumin (BSA), die Lactoglobulin- und die Kaseinfraktion mit einem autoimmunen IDDM in Verbindung gebracht. Die genannten Proteine weisen Sequenzhomologien mit Inselzellantigenen auf. Der exakte Mechanismus ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt [48]. Es wird eine Kreuzreaktivität zwischen Kuhmilchproteinen und Inselzellantigenen vermutet [55].

Bei NOD-Mäusen gelang eine Inhibierung der proinflammatorischen Immunreaktionen durch systemische Verabreichung von bakteriellem Escherichia coli-Immunstimulanz (OM-89). Die Expression der Th2-assoziierten Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  im Darm wurde hochreguliert. Man erklärt diesen Th2-Shift mit einer Desensibilisierung von Makrophagen und anderen APZ. Die orale Administration von bakteriellem Immunstimulanz hemmt die Th1-Reaktivität im Darm und fördert gleichzeitig Mechanismen, die der „oralen Toleranz“ zugrunde liegen [56].

Eine signifikante Unterdrückung der Insulitis und der Diabetesprogression im NOD-Modell konnte durch die kombinierte orale Gabe von Insulin und bakteriellem Immunstimulanz (OM-89) gezeigt werden. Der Effekt korreliert mit einer gesteigerten Th-2-Immunantwort und einer verminderten iNOS-Expression im Darm [36].

Auch die alleinige orale Administration von Insulin in adäquaten Dosen konnte den suppressiven Effekt erzielen [34, 57]. Immunhistochemische Untersuchungen der isolierten Pankreata detektierten hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-Zellen. Makrophagen machten nur einen sehr geringen Anteil der infiltrierenden mononukleären Zellen aus. Der Befund einer milden Insulitis wurde durch ein Th2-dominantes Zytokinmuster (IL-10, TGF- $\beta$ ) und verminderte Th1-Zytokinproduktion (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) unterstützt [34].

Auf der Ebene der diabetischen Inselentzündung weisen die Mechanismen der Adhäsion und Extravasation von inselinfiltrierenden Lymphozyten auf eine immunologische Kopplung an das Darmimmunsystem hin. Lymphozyten und Endotheliale Adhäsionsmoleküle, welche die Migration der Lymphozyten im GALT beeinflussen, konnten sowohl bei der NOD-Maus, als auch beim humanen IDDM während der Insulitis im Pankreas identifiziert werden [48].

Diese Erkenntnisse zeigen die Möglichkeit, über die Darmmukosa Einfluss auf das Immungeschehen in umliegenden Organen, im Fall des Diabetes das Pankreas, zu nehmen.

### **1.9 DNA-Vakzinierung**

Die Immunisierung mit DNA-Vakzine ist eine relativ junge Disziplin auf dem Gebiet der Immunprophylaxe. Das Wirkprinzip beruht auf einer Einschleusung von codierenden DNA-Fragmenten in Körperzellen, die dann das codierte Antigen selbstständig synthetisieren [58].

1990 konnte erstmals ein direkter in vivo Gentransfer bei Mäusen gezeigt werden. *Wolff et al.* injizierte aufgereinigte DNA oder RNA in die Skelettmuskulatur und konnte noch 60 Tage nach der Inokulation die Aktivität der codierten Enzyme nachweisen [59].

Die Stimulation des Immunsystems und die präventive bzw. therapeutische Wirkung von DNA-Impfstoffen konnte im Tiermodell mehrfach demonstriert werden. Infektiöse Erkrankungen, Tumoren, Allergien und auch autoimmune Krankheitsbilder sind in DNA-Vakzinierungsstudien erfolgreich einbezogen worden [59].

Die DNA-Vakzinierung bietet einige Vorteile gegenüber den geläufigen Impftechniken. Im Vordergrund stehen die Reinheit, die physicochemische Stabilität und die prinzipiell leichte Herstellung von Plasmid(p)DNA-Vakzine. Ausserdem ist es möglich, mit einer einzigen Impfdosis gleich mehrere Immunogene zu kombinieren.

Die Kosten für Herstellung und Lieferung sind weitaus geringer als für herkömmliche Impfstoffe, wie z.B. für rekombinante Proteine.

Die Effizienz von pDNA ist besonders hervorzuheben. Der DNA-vermittelte Transport scheint die Expression der codierten Antigene in ihrer nativen Form zu erleichtern. Die Antigenpräsentation und die Aktivierung einer Immunantwort wird optimiert. Sowohl die Bildung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, als auch CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen kann mittels DNA-Vakzine erzeugt werden. Diese Zellen induzieren entsprechend humorale bzw. zytotoxische Immunantworten [59].

Natürlich müssen auch einige weniger vorteilhafte Aspekte der DNA-Vakzinierung berücksichtigt werden. Es wäre denkbar, dass die codierende pDNA in das Genom des Individuums eingebaut wird. Dies könnte zu Mutationen und Tumorgenese führen.

Desweiteren könnte die Synthese von anti-DNA-Antikörpern provoziert werden. In Studien konnte bisher keine dieser potentiellen Gefahren bestätigt werden.

Auch die Induktion einer Toleranz bzw. das Aufheben einer Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen ist eine mögliche unerwünschte Wirkung. Bei neugeborenen Mäusen konnten beide Effekte beobachtet werden [59].

Zahlreiche Applikationsvarianten (i.m., i.p., s.c., i.v., intradermal) wurden im Tier geprüft und analysiert. Die intraperitoneale Injektion erwies sich als gänzlich ungeeignet für die Vakzinierung mit pDNA [58].

Die Form der Applikation der pDNA ist durchaus ausschlaggebend für die Auslösung unterschiedlicher Immunantworten. Der Eintritt über die Haut mittels der sogenannten „gene gun“-Methode ist mit einer Th2-gerichteten Immunantwort gekoppelt. Im Mausmodell werden primär IgG1-Antikörper gebildet. Die i.m.-Injektion zeigt bei der Maus eine Th1-gerichtete Antwort mit vermehrter Synthese von IgG2a-Antikörpern [60].

Die intranasale oder orale Applikation ist eine sehr effektive Administrationsform, um Immunantworten über die Schleimhäute hervorzurufen [59, 61, 62].

Die Option zur Manipulation der Th1/Th2-Balance durch DNA-Vakzinierung stellt eine vielversprechende Technik zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten dar [60, 63].

Die orale Immunisierung mit einer Rotavirus DNA-Vakzine löste in vivo bei BALB/c-Mäusen eine protektive Immunantwort aus. Es konnten Rotavirus-spezifische Serumantikörper und intestinales IgG detektiert werden [61].

Man erklärt den Wirkmechanismus der pDNA nach der oralen Aufnahme wie folgt. Im Darm kommt es zu einer Aufnahme der DNA-Segmente bis in die Zellkerne. Hier erfolgt die Transkription in mRNA. Die Transkription der Gene wird durch spezifische Promotorregionen kontrolliert. Hier benutzt man z.B. Promotoren für humanes  $\beta$ -Aktin, Rous Sarkoma Virus (RSV) oder Cytomegalovirus (CMV). Letzterer besitzt eine ausgeprägte Spezifität, die eine höhere Expressionsrate ermöglicht [59].

Der genaue Transportmechanismus der DNA in die Zellkerne ist noch nicht komplett entschlüsselt. Lineare DNA erweist sich gegenüber enzymatischen Prozessen als wesentlich empfindlicher als pDNA. Dies spricht für die Applikation von ringförmiger DNA [58].

Der Transkription schliesst sich die Biosynthese der codierten Proteine an. Die exprimierten Proteine entfalten Ihre Funktion als Antigene. Die Antigene sind in der Lage, eine humorale und zelluläre Immunantwort zu induzieren. Es kommt zu der Bildung von Antikörpern und Antigen-reaktiven T-Zellen ( $CD8^+$  und  $CD4^+$ ) [59, 63].

Die Diabetesrate konnte im Mausmodell durch intramuskuläre Injektion von Plasmid-DNA, welche codierend für die Insulin-B-Kette war, um 50 % reduziert werden. Die Insulin-B-Kette regte regulative  $CD4^+$  Lymphozyten zur vermehrten IL-4-Synthese an [18].

Beim cyclophosphamidinduzierten Diabetes der NOD-Maus wurde durch die intramuskuläre Injektion von codierender Plasmid-DNA für eine Sekretform des GAD (Glutamic Acid Decarboxylase) eine Th2-Immunantwort ausgelöst, die sich präventiv auf das Krankheitsgeschehen ausgewirkt hat. Die Mausserumanalyse des anti-GAD IgG-Titers deutet darauf hin, dass die Injektion von GAD-codierender DNA möglicherweise mit einer steigenden Th2-Immunreaktion gekoppelt ist [64].

### **1.10 Hitzeschockprotein 60**

Das Heat Shock Protein 60 (Hsp60) zählt zu den sogenannten Hitzeschock- oder Stressproteinen, die in allen lebenden pro- und eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie vergrössern die Toleranz gegenüber massiver Hitzeeinwirkung und Stress.

Initiator für eine solche Hitzeschockantwort sind extreme Temperatur-, aber auch Stresseinwirkungen, die eine gesteigerte Synthese der Hitzeschockproteine induzieren [67]. Ausserdem sind die Hsps an der Proteinfaltung, an der Zusammenlagerung von Proteinkomplexen und am Proteintransport beteiligt.

Man spricht bei den Hitzeschockproteinen von sog. Molekularen Chaperonen. Desweiteren haben sie eine Bedeutung für immune und autoimmune Prozesse [65]. Die Nomenklatur der Hitzeschockproteine wird gemäss des individuellen Molekulargewichtes vorgenommen. So entspricht das Hsp60 einem 60 kD-Protein [66].

Das Hsp60 wird sowohl im endokrinen als auch im exokrinen Pankreas exprimiert. Ebenso können autoreaktive T-Zellen, die gegen das Hsp60 gerichtet sind, detektiert werden. Den autoimmunen T-Zellen konnte ein pathogener Effekt bei der selektiven  $\beta$ -Zelldestruktion im NOD-Mausmodell nachgewiesen werden. Die T-Zellspezifität für einzelne Epitope des murinen Hsp60 scheint bei der  $\beta$ -Zelldestruktion eine Rolle zu spielen.

In NOD-Seren konnten Autoantikörper gegen mykobakterielles Hsp60 ausschliesslich bei solchen Tieren gemessen werden, die später einen Diabetes entwickelten. Die nicht-diabetischen Tiere waren antikörperfrei [68].

*Elias et al.* zeigten „Hsp60 Peptid p277“ als therapeutisches Agens zur Diabeteshemmung. Die systemische Behandlung mit diesem Peptid konnte eine Progression der Inselentzündung hemmen bzw. einen rückläufigen Infiltrationsprozess bewirken [69]. Mit T-Zellen gegen Hsp60 p277 war eine Vakzinierung bei NOD-Mäusen gegen einen autoimmunen Diabetes durchführbar [70,71]. *Quintana et al.* gelangen eine Modulation der Hsp60-Autoimmunität bei NOD-Mäusen durch Vakzinierung mit Plasmid-DNA. Das für Hsp60-codierende pDNA-Konstrukt konnte die Diabetesentwicklung hemmen [73].

Transgene NOD für murines Hsp60 zeigten eine verstärkte Expression des Transgens in Thymus und Knochenmarkzellen. Immunologisch konnte keine Toleranzinduktion gegen das Protein festgestellt werden. Die Entstehung einer Insulinitis war bei den transgenen Tieren stark vermindert [72].

### 1.11 Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1

Adhäsionsmoleküle sind Membranproteine, die interzelluläre Wechselwirkungen vermitteln. Bei diesen Wechselwirkungen handelt es sich um Erkennungs- und Adhäsionsfunktionen [74].

*Edelmann et al.* prägten 1983 den Begriff der „Cell Adhesion Molecules (CAM)“ [75]. Hierzu zählt auch das ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) aus der Superfamilie der Immunglobuline. Es bildet 5 extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen aus und besitzt einen zytoplasmatischen und einen transmembranen Teil.

Primär wird das ICAM-1 auf hämatopoetischen Zellen, wie Leukozyten und Granulozyten exprimiert. Aber auch zahlreiche Endothelien, Dendritische Zellen und Fibroblasten können ICAM-1 ausbilden [74].

Dem ICAM-1 fallen wichtige Migrations- und Diapedeseaufgaben zu, welche besonders immunologische Bedeutung haben. Das ICAM-1 ist an der Zirkulation von Leukozytensubpopulationen im Blut, wie auch an der Diapedese in Zielgewebe im Rahmen von entzündlichen Reaktionen beteiligt. Eine Steigerung der ICAM-1-Expression erfolgt nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1) um den Faktor 2 bis 5 und es kommt zu einer vermehrten Ausbildung auf den Zelloberflächen [74, 76]. Die aktivierten Adhäsionsmoleküle intensivieren die Bindungsstärke zu ihren Liganden und die Transmigrationsprozesse können von statten gehen [77].

Die Interaktionen mit den T-Zellen erfolgen an sogenannten Lymphozytenfunktions-Antigenen (LFA). Sie vermitteln die antigenunabhängige Bindung an Rezeptoren auf anderen Zellen. Das ICAM-1 bindet an den LFA-1-Rezeptor. LFA-1 gehört zu der Integrin-Superfamilie der Adhäsionsmoleküle und kommt auf den meisten Leukozyten vor. Durch Signalübertragung trägt es vermutlich zur Aktivierung von T-Zellen bei [78]. Neben der membrangebundenen Form konnte eine im Serum gelöste Form des ICAM-1 identifiziert werden, welche von mononukleären Zellen synthetisiert wird [79]. So konnten nachweislich bei Entzündungen und immunmedierten Prozessen erhöhte Serumspiegel gemessen werden.

Es zeigt sich die diagnostische und pathophysiologische Bedeutung des ICAM-1 für den insulinpflichtigen Diabetes. Die Diapedese ist essentiell für das Infiltrationsgeschehen in den Langerhans-Inseln; die zelluläre Immunität spielt eine entscheidende Rolle bei der  $\beta$ -Zelldestruktion. Immunhistologisch konnte auf den infiltrierenden murinen mononukleären Zellen eine starke Expression von ICAM detektiert werden [81]. Für den Cyclophosphamid-induzierten Diabetes der NOD-Maus weisen weitere Studien auf ein erhöhtes ICAM-1-Vorkommen in den späteren Phasen des Entzündungsgeschehens hin [44].

Für das lösliche ICAM-1 konnte ein immunmodulatorischer und protektiver Effekt für den spontanen murinen IDDM erkannt werden. Nach Administration von rekombinantem, löslichem ICAM-1 gelang eine fast vollständige Hemmung der Diabetesprogression. Die Verminderung der Insulitis ist auf eine Verminderung der Diapedese der Leukozyten und eine reduzierte T-Zellaktivierung zurückzuführen [82].

### **1.12 Arbeitshypothese und Versuchsmodell**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zwischen der prädiabetischen Inselentzündung und dem Darmimmunsystem während der Krankheitsentstehung des Typ 1 Diabetes auf der Ebene der Th1/Th2-Immunbalance. Versuchsmodell ist die NOD-Maus. Die Untersuchungen untergliedern sind in drei Forschungsansätze.

Ein Ansatz untersucht die krankheitsbeschleunigende und -synchronisierende Wirkung von Cyclophosphamid im NOD-Mausmodell. Histologische Untersuchungen der Langerhans-Inseln sollen die Migrationsprozesse von mononukleären Zellen in die Langerhans-Inseln des Pankreas während der Cyclophosphamid-beschleunigten Insulitisentstehung dokumentieren. Es soll gezeigt werden, dass sich dieser Prozeß in unterschiedliche, sogenannte Insulitisgrade unterteilen lässt.

Die Untersuchungen im zweiten Forschungsansatz beschäftigen sich mit der Zytokingenexpression im Dünndarm unter Einfluss von Cyclophosphamid. Auch hier werden die experimentellen Untersuchungen an NOD-Mäusen durchgeführt. Es soll geprüft werden, ob die Zytokingenexpression im Darm während der prädiabetischen Krankheitsphase beeinflusst wird. Die Analysen sollen Aufschluss über den intestinalen Immunstatus und die Th1-/Th2-Immunbalance der Tiere während der Diabetesentwicklung geben.

Es wurden die mRNA-Level von IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  mittels semiquantitativer RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction) vor und nach einer Behandlung mit Cyclophosphamid gemessen.

In einem dritten Forschungsansatz wird histologisch analysiert, ob die orale Gabe von codierender pDNA-Vakzine einen möglichen präventiven bzw. inhibierenden Effekt auf das prädiabetische Entzündungsgeschehen im Cyclophosphamid-synchronisierten NOD-Mausmodell hat. Proteine, codierend für  $\beta$ -Aktin, TGF- $\beta$ , mycobakterielles Hsp60 und humanes, lösliches ICAM-1 wurden in einen pcDNA3.1-Vektor subkloniert. Das  $\beta$ -Aktin fungierte als Kontrolle. Das Th2-Zytokin TGF- $\beta$ , wurde als Gegenregulator für eine Th1-Antwort eingesetzt. Von Hsp60 und löslichem ICAM-1 wurde ein möglicher suppressiver Effekt während der Diabetesprogression und des Insulitisgeschehens überprüft. Für beide Parameter konnten bereits präventive und inhibierende Wirkungen für den IDDM nachgewiesen werden [72, 82].

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, weitere Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen der Krankheitsentstehung des IDDM, der prädiabetischen Inselentzündung und dem Darm bzw. Darmimmunsystem zu erlangen. Die Vakzinierungsexperimente sollen im Verlauf der prädiabetischen Inselentzündung die Krankheitsentwicklung durch Modulation des Th1-/Th2-Gleichgewichtes präventiv oder inhibierend beeinflussen. Es soll untersucht werden, ob aufgrund des Th1-/Th2-Antagonismus der autoimmune Krankheitsverlauf von Th1-Zytokinen verursacht oder beschleunigt wird und ob Th2-Zytokine eine autoimmune Krankheitsentwicklung hemmen bzw. lindern können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Tiere und Haltungsbedingungen**

Die tierexperimentellen Studien wurden mit weiblichen NOD-Mäusen (nonobese diabetic mice) durchgeführt. Herkunft der Tiere (NOD/Bom) ist die Firma M&B (Møllegaard & Bomholtgard), Ry, Dänemark. Die Mäuse wurden in Gruppen unter keimarmen Bedingungen in Makrolon-Käfigen vom Typ II oder III untergebracht. Sie erhielten das Standardpressfuttermittel ‚sniff‘ der Firma Sniff GmbH, Soest und Trinkwasser ad libitum. Die Klimatisierung des Tierlabors erfolgte durch eine Unterdruckanlage. Die mittlere Raumtemperatur betrug 20°C mit einer durchschnittlichen Luftfeuchte von 60 %.

Zu Versuchsbeginn der Vakzinierungsstudie waren die Tiere 70 Tage alt. Die NOD-Mäuse aus der Darmstudie waren zu Versuchsbeginn 42 bis 49 Tage alt. Alle Versuchstiere befanden sich somit zu Beginn der Experimente in einer prädiabetischen Phase.

#### **2.1.2 REAGENZIEN**

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose Qualex Gold	AGS, Heidelberg
Albumin Fraktion V (98 % pulv. Bovine)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin (98 % titr.)	Sigma- Aldrich, Deisenhofen
Aqua inj.	SB Pharma, München.
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cyclophosphamid (Endoxan®)	Asta Medica, Frankfurt
DAB Peroxidase Substrat	Dako, Hamburg
DEPC	Sigma- Aldrich, Deisenhofen
DNA Leiter (100 bp)	Gibco/LifeTechn., Karlsruhe
DTT (0,1 M)	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
EDTA (Natriumsalz)	Sigma- Aldrich, Deisenhofen
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Jung, Nussloch
Eosin B	Merck, Darmstadt
Ethanol (reinst)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Eukitt Einschlussmittel	O. Kindler GmbH&Co.,Freiburg

Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
Fettstift S2002 (Pen for ICH)	Dako, Hamburg
Formaldehydlösung (37 %)	Merck, Darmstadt
Gene Amp <sup>®</sup> -Kit (10xPCR BufferII; MgCl <sub>2</sub> )	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Glyzerin	ICN Biomedicals, Eschwege
Meerschweinchen Anti-Insulin Antikörper A564	Dako, Hamburg
Hämatoxyllin II nach Gill (mod. Lösung)	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco/LifeTechnologies, Karlsruhe
Isopentan	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Serva, Heidelberg
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhof
Natriumacetat (NaCH <sub>3</sub> O <sub>2</sub> * 3H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
NaOH (0,4 M)	Merck, Darmstadt
Normales Maus Serum X0910	Dako, Hamburg
Normales Ziegen Serum	Dako, Hamburg
RNAasin <sup>®</sup> Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Madison, WA, USA
RNA Leiter (0,16- 1,77 kb)	Gibco/LifeTechn., Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfat Crystal (1 % SDS)	Merck, Darmstadt
SOC-Medium	Invitrogen Groningen, Niederlande
Tris	Roth, Karlsruhe
Tryptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Vectastain ABC-Peroxidase Kit	Vector Lab., CA, USA
Normal Goat Serum, biotynyl. Anti-guinea pig IgG, ABC-Peroxidase-Komplex → A= Avidin DH; B= biotynyl. Merrettich Peroxidase)	
Wasserstoffsuperoxid	Merck, Darmstadt
Xylenzyanol FF	
Xylol (reinst)	Merck, Darmstadt
Reagenzwasser: (reinst, Widerstand $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ )	selbst hergestellt mit dem Wasseraufbereitungssystem <i>Milli-Q UF plus</i> (Millepore, Molsheim, Frankreich)

### 2.1.3 VERBRAUCHSMATERIAL

Cryo-Röhrchen Cry1JS (1,2 ml)	Roth, Karlsruhe
Deckgläser (24x50 mm)	Menzel, Braunschweig
Einmalkanülen	Terumo, Leuven, Belgien
	Microlance, Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
gebogene Knopfkanülen	Eickemeyer, Tuttlingen
Labor-pH-Meter 300 Series	Beckmann, München

Objektträger Super Frost (76x26 mm)	Menzel, Braunschweig
PCR-Röhrchen	Biozym, Oldendorf
Petrischalen (Einmalgebrauch)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen:	
Eppendorf	Hamburg
Sarstedt	Nürnbrecht
Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
Fintip	Bayer, Düsseldorf
Polypropylenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
	Greiner, Solingen
96-well-PCR-Platten Thermo Fast 96	Advanced Biotechnologies, Surrey, UK
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nürnbrecht

### 2.1.4 GERÄTE

Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
Bakterienschüttler 37°C Certonat H	Braun, Melsungen
chirurgisches Besteck	Aesculap, Tuttlingen
	Martin, Tuttlingen
DNA-Elektrophorese-Gel-Kammer	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
	Advanced Biotechnologies, Surrey, UK
	Savant, Farmingdale, NY, USA
DNA-Speed-Vac <sup>®</sup> DNA 110	
ELISA-Photometer	
Molecular Devices Emax precision plate reader mit Software SOFTmax	Sunnyvale, CA, USA
Feinwaage Mettler AC88 Delta Range	Mettler, Giessen
Finnpipette (8-Kanal)	Labsystems, Frankfurt/Main
Fotomikroscopieeinrichtung Orthomat E	Leitz, Wetzlar
Gelelektrophoresekammer	Adv. Biotechnologies, Surrey, UK
	Applied Biosystems, Weiterstadt
Genetic Analyzer 310 ABI Prism <sup>™</sup>	Sartorius, Göttingen
Grobwaage BP610	
Inkubationswanne (Histologie)	
Kryostat CM 3000 Jung	Vertrieb Leica, Nussloch
Laborwaage Sartorius MC1 LC4200	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop Laborlux S	Leitz, Wetzlar
Lumi-Imager	Boehringer-Mannheim, Mannheim
mit LumiAnalyst (3.0)-Software	Janke&Kunkel, Staufen
Magnetrührer IKAMAG <sup>®</sup> RCT	Aldi
Mikrowelle Lunik 250	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
	Hirschmann, Ebernstadt
Pipettierhilfen ‚pipetus junior‘	

Programmable Thermal Controller PTC-100	Biozym, Oldendorf
RNA-Gelelektrophoresekammer Owl's Standard	Peqlab, Erlangen
Spektrophotometer DU®650	Beckmann, München
Stepper Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Lamin Air HB 2472	Heraeus, Hanau
Multistepper (8-Kanal-Pipette)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Modell 5436	Eppendorf, Hamburg
Wärmeschrank 2735	Köttermann, Uetzel/Hänigsen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Ultra-Turax T25	Janke&Kunkel, Staufen
UV-Transiluminator	AGS, Heidelberg
Vortexer VFZ	Janke & Kunkel, Staufen
Zentrifugen:	
Allerga TM 21R Centrifuge	Beckmann, München
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
GS-15R Centrifuge	Beckmann, München
Mikrofuge E	Beckmann, München
Sorvall RC5C	Sorvall, Bad Homburg
Sorvall SS-34	Sorvall, Bad Homburg

### 2.1.5 Stammlösungen, Medien, Puffer

„Alkaline-Lysis-Puffer“	75 µl 75 µl	NaOH (0,2M) SDS (1%)
DNA-Load-Probenpuffer (6fach, pH 7,8)	0,25 % 0,25 % 30,0 %	Bromphenolblau Xylenzanol FF Glycerol ad Reagenzwasser
100 bp-DNA-Leiter	50 µl 1950 µl 400 µl	100 bp DNA-Ladder (1 µg/ml) TE- Puffer DNA-Probenpuffer Lagerung bei 4°C
MOPS-Puffer (10fach)	41,86 g 6,80 g 3,72 g	MOPS (200 mM) Natriumacetat EDTA (10 mM) ad Reagenzwasser auf 1 Liter
Neutralisierungslösung	300 µl 150 µl 50 µl	MQ-Wasser Natriumacetat (pH 4,9, 3 M) NaCl (5 M)

PBS-Puffer Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (5fach, pH 7,5)	20,0 g 3,6 g 0,48 g 0,5 g	NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KCl ad 400 ml Reagenzwasser
RNA-Load-Probenpuffer (1fach)	50 % 1 mM 0,1 % 0,1 %	Glyzerin EDTA (pH 8) Bromphenol- Blau Ethidiumbromid
TBE-Puffer (5fach, pH 8,3)	60,55 g/l 26,70 g/l 3,27 g/l	Tris (500 mM) Borsäure (430 mM) EDTA (10 mM) Reagenzwasser ad 1Liter Lagerung bei 20°C
TE-Puffer (pH 8,0, 1 M)	1,21 g 0,38 g	Tris (10 mM) EDTA (1 mM) Reagenzwasser ad 1Liter

### 2.1.6 Agarosegele

1,2 % RNA-Agarosegel	2,4 g 200 ml 2,4 ml	Agarose MOPS (x0,5) Formaldehyd
1,0 % DNA-Agarosegel	1,0 g 100 ml 3 µl	Agarose TBE (x0,5) Ethidiumbromid
1,5 % DNA-Agarosegel	1,8 g 120 ml 2,4 µl	Agarose TBE (x0,5) Ethidiumbromid

### 2.1.7 Färbelösung

Eosin (0,04 %)	0,2 g 500 ml	Eosin B Ethanol 60 %
----------------	-----------------	-------------------------

### 2.1 8 Medien für Bakterienkulturen

Ampicillin-Stammlösung	25 mg 1,0 ml	Ampicillin Reagenzwasser
------------------------	-----------------	-----------------------------

Agarose Rich Medium	10 g	Tryptone
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	25 g	Agarose
	2 ml	Ampicillin-Stammlösung
	ad 1 l	Reagenzwasser
		Lagerung bei 4°C
LB-Medium	10 g	Tryptone
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	2 ml	Ampicillin-Stammlösung
	ad 1 l	Reagenzwasser
		Lagerung bei 4°C

### 2.1.9 Enzyme

AmpliTa <sup>q</sup> ®- Polymerase	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Ligase	Biolabs, Frankfurt/Main
Restriktionsenzyme: EcoRV, HindIII, NotI, Sall, XhoI	
	Biolabs, Frankfurt/Main
	Boehringer, Mannheim
RNAse	Biolabs, Frankfurt/Main

### 2.1.10 DNA-Oligonukleotide für die RT-PCR

Auflistung der Sequenzen der verwendeten DNA-Oligonukleotide.

Es handelt sich um murine Primer der Firma Life Technologies, Karlsruhe.

#### β-Aktin (5'→3')

Sense: CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG

Antisense: TCA TAG ATG GGC ACA GTG TG

Fragmentlänge des PCR-Produkts (amplifizierte cDNA): 166 bp

IFN- $\gamma$  (5'→3')

Sense: ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC

Antisense: TTC GCC TTT TCC TCA GCG ACG

Fragmentlänge des PCR-Produkts (amplifizierte cDNA): 465 bp

INTERLEUKIN-10 (5'→3')

Sense: TCC TTA ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG

Antisense: GAC ACC TTG GTC TTG GAG CTT ATT AAA ATC

Fragmentlänge des PCR-Produkts (amplifizierte cDNA): 258 bp

TNF- $\alpha$  (5'→3')

Sense: TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC

Antisense: GTA TGA GAT AGC AAA TCG GCT GAC GGT GTG GG

Fragmentlänge des PCR-Produkts (amplifizierte cDNA): 354 bp

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Analyse der Zytokingenexpression im Darmimmunsystem während der Cyclophosphamid-induzierten Krankheitsentwicklung**

#### **2.2.1.1 Versuchsdurchführung**

Die insgesamt 20 weiblichen NOD-Versuchstiere wurden in 3 Gruppen zu einmal 8 und zweimal 6 Tieren aufgeteilt. Die Gruppe „0 Tag“ (0D) wurde keiner Behandlung unterzogen und die Tiere sofort am Tag 0 durch Genickluxation getötet.

Den Tieren der Gruppen „3D“ und „10D“ wurde am Tag 0 Cyclophosphamid intraperitoneal nach Gewicht injiziert. Die verabreichte Dosis war 250 mg Wirkstoff pro Kilogramm Körpergewicht. Die beiden Behandlungsgruppen sind jeweils am Tag 3 bzw. am Tag 10 nach erfolgter Injektion getötet worden.

Bei der Sektion wurden von jeder Maus Abschnitte des Jejunums ohne Peyer-Plaques gewonnen. Die Darmabschnitte wurden mit PBS durchspült, in ca. 2 cm lange Abschnitte geteilt und im flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Gruppe	Anzahl (n = 20 NOD)	Organentnahme	Behandlung (Tag 0)
NOD/ 0D	n = 8 Tiere	Tag 0	Keine Behandlung
NOD/ 3D	n = 6 Tiere	Tag 3	250 mg/kg Cyclophosphamid
NOD/10D	n = 6 Tiere	Tag 10	250 mg/kg Cyclophosphamid

Tab. 1: Behandlungsprotokoll

#### **2.2.1.2 Zeitschema der Versuchsdurchführung**



\*TAG 0: *Darmisolation der Gruppe „0D“  
Applikation von Cyclophosphamid an die Gruppen „3D“ und „10D“*

\*TAG 3: *Darmisolation der Gruppe „3D“*

\*TAG 10: *Darmisolation der Gruppe „10D“*

### **2.2.1.3 RNA-Isolation aus dem Dünndarm der NOD/Bom-Mäuse**

Das tiefgefrorene Dünndarmgewebe wurde in eisgekühlte Reaktionsgefäße mit je 2 ml Trizol-Reagenz gegeben, mittels Ultra-Turrax homogenisiert und im Anschluss 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 0,4 ml Chloroform wurden die Proben 15 Sekunden mittels Vortexer durchmischt und für weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Nach Zentrifugation (15 Minuten, 4°C, 12000 x g) wurde die RNA-haltige, wässrige Oberphase gewonnen, in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und die mRNA mit 1.0 ml Isopropyl-Alkohol gefällt. Es folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur von 5 Minuten.

Durch Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 12000 x g) wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde nach vorsichtigem Abpipettieren der oberen Phase mit 2 ml 75 % DEPC-EtOH (gekühlt auf -20°C) versetzt und anschliessend zentrifugiert (5 Minuten, 4°C, 7500 x g).

Der Überstand wurde verworfen, das verbliebene Pellet 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschliessend in 600 µl Aqua inj. durch vorsichtiges Resuspendieren aufgenommen.

Es folgte eine weitere Inkubation von 10 Minuten bei 55 - 60°C im Wärmeschrank und anschliessend eine sofortige Kühlung auf Eis.

Im Anschluss wurde die spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration vorgenommen.

Zur Lagerung wurden die Proben mit 1 % (v/v) RNAsin Ribonuklease-Inhibitor und 1 % (v/v) DTT (0,1 M) versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.2.1.4 Spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die RNA-Proben wurden spektralphotometrisch gemessen und die Extinktionen bestimmt.

Die RNA-Proben wurden mit TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,5) 1:200 verdünnt und die Extinktionen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen.

Das Verhältnis der beiden Wellenlängen ( $E_{260}/E_{280}$ ) ist ein Indikator für die Reinheit der präparierten RNA. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $E_{260}$ ) wird einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml gleichgesetzt.

#### **2.2.1.5 RNA-Gelelektrophorese**

Auf einem 1,2 %igen Agarosegel wurde die Reinheit der RNA-Präparation überprüft. Als Laufpuffer wurde ein 1facher MOPS-Puffer eingesetzt.

Je 2 µg RNA-Probe und 2 µg RNA-Leiter (1 µg/µl, 0,16 – 1,77 kb) wurden mit MQ-Wasser auf 8 µl aufgefüllt, für 3 Minuten bei 65 °C im Wasserbad denaturiert und anschliessend sofort auf Eis gekühlt. Die Proben wurden mit 2 µl RNA-Ladepuffer (enthält 0,1 % Ethidiumbromid) versetzt und das RNA-Gel mit je 10 µl Probenvolumen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 85 - 100 Volt über 50 Minuten. Der Interkalator Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen. Unter UV-Bestrahlung wird dieser Komplex zur Fluoreszenz angeregt und ermöglicht so die Detektion und Quantifizierung von RNA und DNA. Unter UV-Betrachtung werden charakteristische Banden sichtbar. Im vorliegenden Gel zeigen sich zwei deutliche Banden, eine 18S-RNA und eine 28S-RNA.

#### **2.2.1.6 Reverse Transkription**

Als Reverse Transkription bezeichnet man die enzymatische Reaktion, bei der die mRNA aus der Gesamt-RNA in complementary (c)DNA umgeschrieben wird. Nach Anlagerung eines Oligo-dt-Startprimers an den Poly-A-Schwanz der mRNA wird ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Das katalysierende Enzym ist die Reverse Transkriptase.

Die hier verwendete Reverse Transkriptase stammt aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV-RT/ modifiziert SuperScript™ Gibco) und ist eine RNA-abhängige DNA- Polymerase.

1 - 2 µg RNA wurden für 90 Sekunden bei 60°C im Wasserbad denaturiert, um ihre Sekundärstruktur aufzuschmelzen. Die PCR-Röhrchen wurden sofort auf Eis kühl gestellt und 34 µl/Röhrchen eines speziellen „RT-Master-Mixes“ (Gene Amp Kit®) gemäss Protokoll zugefügt.

34 µl Ansatz RT-Master-Mix bestehen aus:

MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8 µl
10x PCR-Puffer II (100 mM TRIS HCl, pH 8,3, 500 mM KCl)	4 µl
Nuc Mix (aus gleichen Anteilen dATP, dCTP, cGTP, dUTP)	16 µl
RNAse Inhibitor	2 µl
Reverse Transkriptase	2 µl
Oligot-dt-Primer	2 µl

Im Thermocycler wurde folgendes Programm für die Reverse Transkription gewählt:

90 Minuten	42°C
5 Minuten	95°C
Kühlung auf	4°C

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von spezifischen cDNA-Sequenzen. Die typische Reaktion erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Phasen: die Denaturierung, die Annealingphase und die Elongation.

Die cDNA-Templates wurden in 96-well-Platten titriert. Auf jeder Platte wurden neben den jeweils acht cDNA-Proben der Darmpräparate noch zwei Kontrollproben aufgetragen, um eine Vergleichbarkeit und einen Abgleich zweier separater PCR-Läufe zu gewährleisten. Bei den Kontrollen handelte es sich um bereits analysierte cDNA-Proben von Darmpräparaten.

Jede cDNA wurde als Doppelwert in Ansätzen von 5 µl in vier Stufen titriert: 3,0 µl, 1,0 µl, 0,33 µl, 0,11 µl. Als Verdünnungsmedium wurde filtriertes Reagenzwasser eingesetzt. Es wurde ein spezifischer „Master-Mix“ (Gene Amp Kit®) mit einem Endvolumen von 20 µl pro well aus folgenden Komponenten gemäss Protokoll pipettiert:



Nach der PCR-Reaktion wurden jedem Well 5 µl DNA-Probenpuffer zugefügt und die foliengeschützte 96-Well-Platte bei –20°C gelagert.

#### **2.2.1.8 DNA-Gelelektrophorese**

Für die semiquantitative RT-PCR wurden ein 96-well-Gel zuzüglich der Aussparungen für den DNA-Längenstandard in einer speziellen DNA-Gel-Elektrophoresekammer gegossen. Die PCR-Ansätze wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt.

1,8 g Agarose wurden in 120 ml TBE-Puffer (0,5fach) in der Mikrowelle aufgeschmolzen und unter Rühren abgekühlt. Vor dem Ausgießen in die Elektrophoresekammer wurden 2,4 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel nach dem Erstarren mit 50 ml 0,5 fachem TBE-Puffer (mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt) als Laufpuffer umspült.

In die entsprechenden ausgesparten Probenaschen wurden jeweils 8 µl PCR-Probenansatz mit einer 8-Kanal-Pipette aufgetragen. Es wurden 2 µl 100 bp-DNA-Leiter als Längenstandard pipettiert.

Die Auftrennung erfolgte über 35 Minuten bei 80 bis 95 Volt.

#### **2.2.1.9 Quantifizierung der PCR-Produkte**

Die Detektion der PCR-Fragmente erfolgte mit dem LUMI-Imager<sup>®</sup> und der zugehörigen Softwareversion LUMI-Analyst 3.0<sup>®</sup> der Firma Boehringer, Mannheim.

Die Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenz der PCR-Banden und des Längenstandards ermöglicht die Identifizierung der PCR-Fragmente bekannter Länge. Diese Fluoreszenzintensität wird in sogenannten Boehringer Light Units<sup>®</sup> (BLU) angegeben.

Für jede cDNA-Probe wurden 4 Titrationen durchgeführt. Die sich daraus ergebenden BLU- Werte korrelieren linear mit den eingesetzten Volumina an cDNA.

Die sich aus den 4 BLU-Werten bildende Standardkurve erlaubt die Bestimmung einer linearen Regressionsgeraden. Diese Quantifizierung ermöglicht die

Bestimmung des Verhältnisses von BLU zum cDNA-Volumen (BLU/ $\mu$ l), d.h. welcher BLU-Wert entspricht wieviel Volumeneinheiten ( $\mu$ l) cDNA.

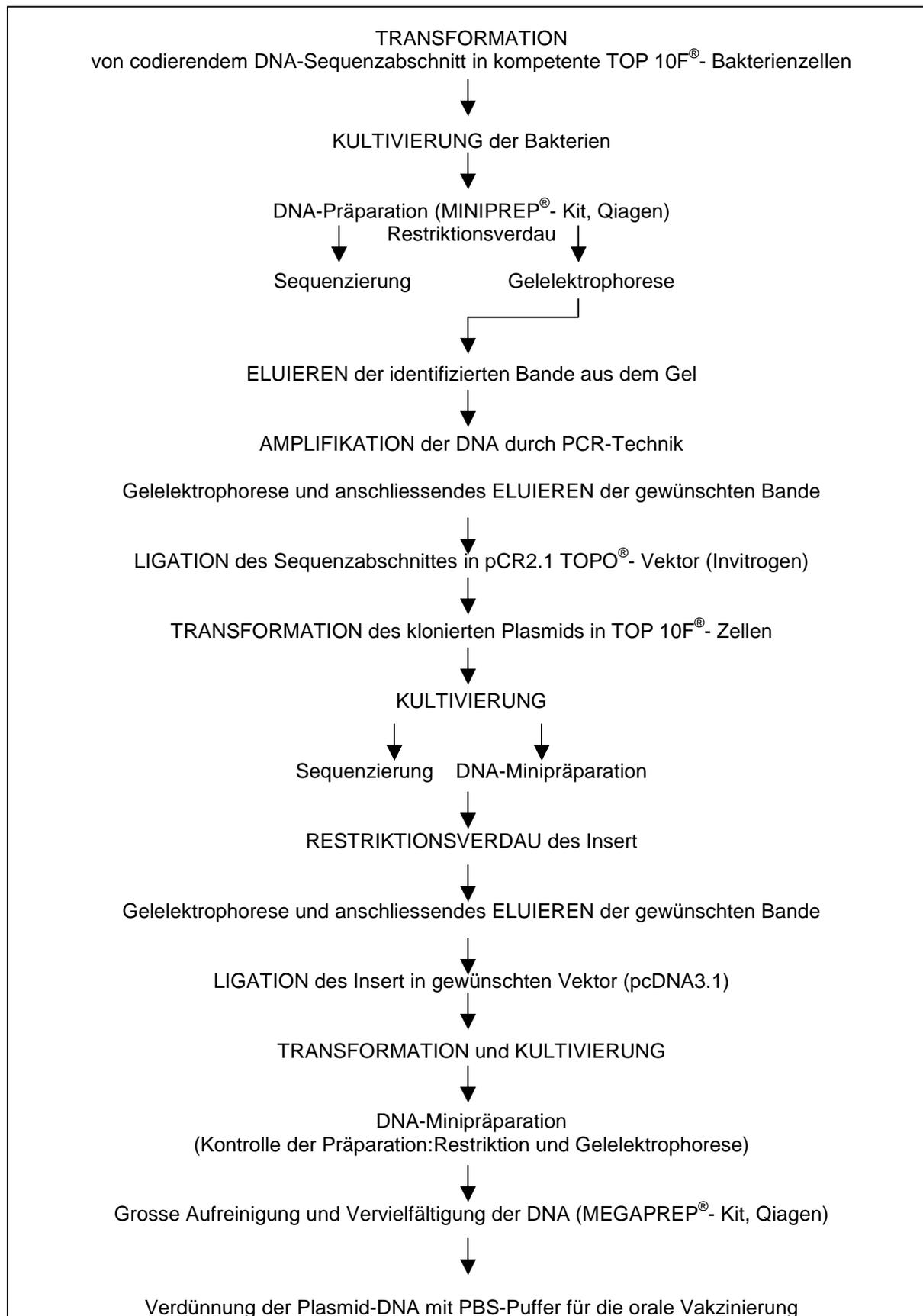
Der Rückschluss auf die Menge für eine bestimmte mRNA wurde durch die Bildung eines Quotienten aus dem Wert BLU/ $\mu$ l eines bestimmten PCR-Fragmentes und dem Wert BLU/ $\mu$ l der  $\beta$ -Aktin-PCR gebildet.

## **2.2.2 ORALE VAKZINIERUNG MIT PLASMID-DNA**

### **2.2.2.1 Methoden zur Klonierungstechnik**

Abb. 2: Flussdiagramm zur Klonierungstechnik. Das Flussdiagramm zeigt eine Übersicht über die zeitliche Abfolge der angewandten Techniken zur Konstruktion der Plasmid-DNA-Vakzine. Es soll einen Gesamtüberblick über die Erstellung der Konstrukte liefern. Die einzelnen Methoden werden im folgenden Kapitel näher besprochen.

### 2.2.2.1 Methoden zur Klonierungstechnik



## 2.2.2 ORALE VAKZINIERUNG MIT PLASMID-DNA

### 2.2.2.2 Insert-DNA

Die codierende complementary (c)DNA für die diversen Proteine, die für die Vakzine von Interesse waren, wurde in Fragmenten in den pcDNA3.1-Vektor subkloniert. Ausnahme bildet das TGF- $\beta$ -Plasmid, welches als fertiges Konstrukt zu erhalten ist.

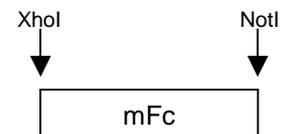
#### Signalsequenz [ss]

Die Signalsequenz ist codierend für ein spezifisches Signalpeptid des membrangebundenen Proteins mICAM-1, welches aus Milzzellen mittels RT-PCR-Technologie kloniert wurde.



#### mIgG2a [mFc]

Bezug: Dr. Markus Walz,  
Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf



#### Murines $\beta$ -Aktin

pc DNA 3.1/ SS –  $\beta$ -Aktin  
pc DNA 3.1/ SS –  $\beta$ -Aktin - Fc

Bezug: G. Reindl,  
Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf  
(ohne mFc-Fragment)

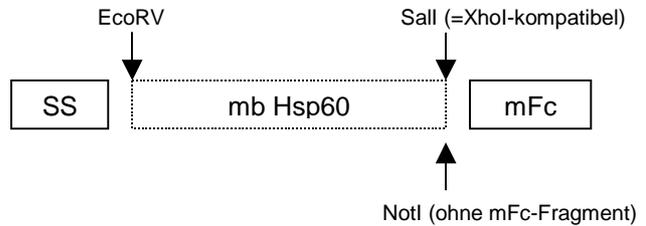


Mycobacterielles Heat Shock Protein 60 [ mbHsp60]

pc DNA 3.1/ SS – mb Hsp60 – Fc

pc DNA 3.1/ SS – mb Hsp60

Bezug: J. Bod de Ruiter, Utrecht University,  
Utrecht, Niederlande

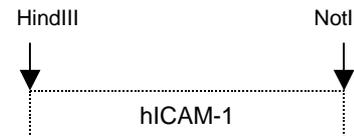


Humanes Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 [hICAM-1]

In der Sequenz für das Protein „hICAM-1“ ist bereits eine Signalsequenz enthalten.

DNA 3.1/ hICAM-1

Bezug: Dr. Stephan Martin,  
Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf

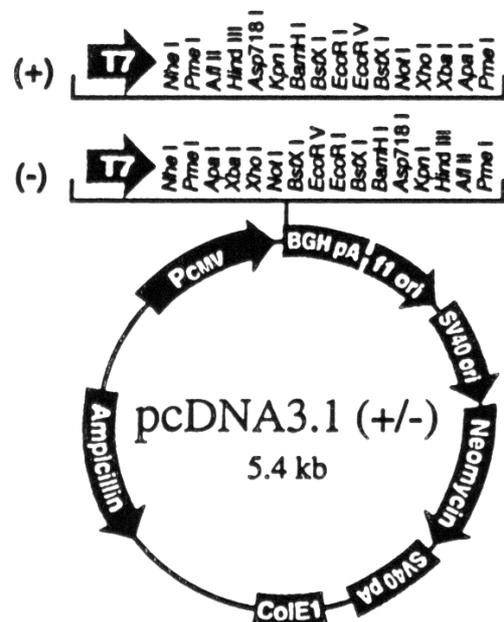


**2.2.2.3 Plasmidkarten der Vektoren**

**\*Abb. 3: pcDNA3.1**

Bezug: Invitrogen, Groningen, Niederlande

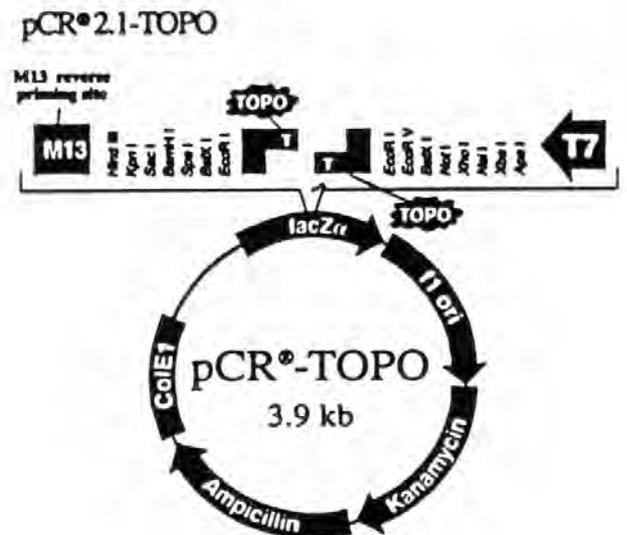
Eigenschaften: CMV-Promotor,  
Ampicillin- und Neomycin-Resistenz



**\*Abb. 4: pCR<sup>®</sup>-TOPO 3.9kb**

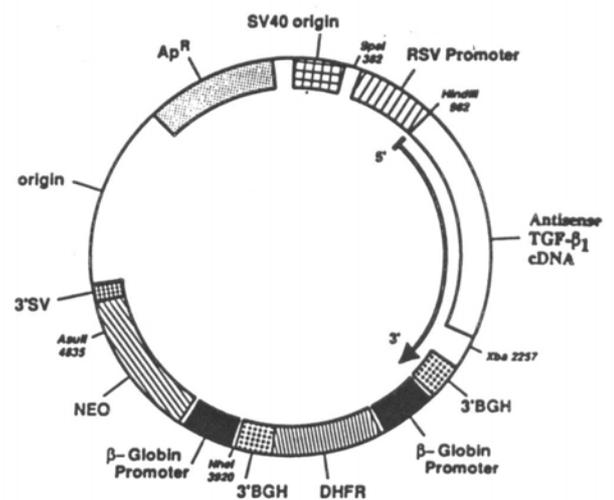
Bezug: Invitrogen, Groningen,  
Niederlande

Eigenschaften: PCR-Cloning-Vektor,  
Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz

**\*Abb. 5: Humaner TGF-β-Vektor (RLDN-β1-S)**

Bezug: ein freundliches Geschenk von  
Dr. H. Ertl, The Wistar Institute,  
Philadelphia, PA

Eigenschaften: RSV-Promotor (Rous Sarcoma Virus),  
Neomycin-Resistenz



\*Alle Abbildungen sind nach Produktinformation modifiziert.

**2.2.2.4 Transformation von Plasmid-DNA in TOP 10F<sup>®</sup>-Bakterienzellen**

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA durch kompetente Zellen. Die Transformation wurde mit dem „TOPO TA Cloning<sup>®</sup>“-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt.

2 µl der Plasmid-DNA-haltigen Lösung wurden mit 50 µl kompetenten TOP 10F-Escherichia Coli-Bakterienzellen durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Im Wechsel erfolgten Inkubationsschritte von 30 Minuten auf Eis, 30 Sekunden bei 42°C und weitere 2 Minuten auf Eis. Es wurden 250 µl SOC-Medium (Invitrogen<sup>®</sup>)

hinzugegeben und die Probe für 30 Minuten bei 37°C im Horizontalschüttler belassen.

#### **2.2.2.5 Kultivierung der TOP 10F<sup>®</sup>-Bakterienzellen**

150 µl von einem Transformationsansatz wurden auf einer Bakterienkulturplatte auf LB-Medium mit Ampicillin ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Einzelne Bakterienkolonien wurden in 4 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C im Horizontalschüttler inkubiert.

#### **2.2.2.6 Mini-DNA-Aufreinigung zur präparativen Plasmid-DNA-Isolierung**

2 - 3 ml der flüssigen Übernachtskultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, 5 Minuten bei 2880 x g zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Pellet in 150 µl Tris-EDTA-Lösung resuspendiert.

Es wurden 150 µl Alkaline-Lysis-Puffer (pH 10) zugegeben, nach dem Vortexen 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals gut geschüttelt bis eine klare Lösung entstand. Nach Zugabe von 500 µl Neutralisierungslösung erfolgte eine weitere Inkubation von 10 Minuten bei -20°C.

Die Proben wurden 10 Minuten bei 23428 x g und 4°C zentrifugiert und 500 µl Überstand mit 750 µl Isopropanol versetzt. Die Ansätze wurden 10 Minuten bei -20°C belassen, dann 10 Minuten zentrifugiert (23428 x g, 4°C), die Überstände dekantiert und die Pellets mit 700 µl gekühltem Ethanol (70 %) gewaschen.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 23428 x g, 4°C) wurden die Überstände sorgsam abgegossen, das DNA-Pellet für 5 Minuten im DNA-SpeedVac<sup>®</sup> getrocknet und anschliessend in einem Premix aus jeweils 5 µl TE und 2 µl RNase aufgenommen.

### **2.2.2.7 Mega-DNA-Aufreinigung zur präparativen Plasmid-DNA-Isolierung**

Um eine höchstmögliche Ausbeute an Plasmid-DNA für die orale Vakzinierung zu gewinnen, wurde mit dem endotoxin-freien „EndoFree Plasmid Mega“<sup>®</sup>-Kit gemäss dem Protokoll der Firma Qiagen, Hilden gearbeitet.

Vor der oralen Applikation wurden jeweils 200 µg DNA in 1 ml PBS-Puffer gelöst.

### **2.2.2.8 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Die Linearisierung von Plasmid-DNA und die Isolierung eines bestimmten DNA-Fragments aus dem Plasmidverband erfolgt mittels einer enzymatischen Restriktionsreaktion.

Die Auswahl der schnittstellenspezifischen Restriktionsenzyme erfolgte mittels der dokumentierten Plasmid- oder auch Restriktionskarten (Abb. 3 bis 5). Diese Karten zeigen die relativen Positionen der Erkennungssequenzen für die Enzyme auf einem DNA-Molekül und geben Informationen über die geeigneten Restriktionsendonukleasen für die gewünschte Schneidereaktion. Die Auswahl der entsprechenden Puffer beruht auf den Angaben der Bezugfirmen Boehringer, Mannheim und Biolabs, Frankfurt/Main.

1 - 2 µg DNA wurden mit je 1 µl pro verwendeter Restriktionsendonuklease und einer äquivalenten Menge (µl) Puffer (gemäß Angaben der Bezugfirmen Boehringer, Mannheim und Biolabs, Frankfurt/Main) versetzt und mit MQ-Wasser auf 20 µl pro Restriktionsansatz aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte 1 Stunde bei 37°C.

### **2.2.2.9 DNA-Gelelektrophorese**

Die durch die Restriktionsspaltung entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die Restriktion wurde auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Das Agarosegel wurde handwarm unter Aussparung der Probenaschen in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde die Kammer mit 0,5 fachem TBE-Puffer aufgefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer

(Probenvolumen/5 =  $\mu\text{l}$  Ladepuffer) versehen und in die Probestaschen des Gels mit 10  $\mu\text{l}$  DNA-Probe bzw. 4  $\mu\text{l}$  100-bp-DNA-Leiter beladen. Die gewählten Laufbedingungen waren 90 bis 100 Volt für 40 Minuten.

Das Gel wurde unter dem UV-Transiluminator bewertet. Durch die Ethidiumbromid-Färbung erkennt man die Banden an den Positionen, die den verschiedenen Grössenklassen der DNA-Fragmente entsprechen.

#### **2.2.2.10 Eluieren von DNA aus einem Agarosegel**

Das Eluieren der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit dem „Qiaex II Agarose Gel Extraction“<sup>®</sup>-Kit der Firma Qiagen, Hilden.

Die unter UV-Licht identifizierte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Entsprechend des ermittelten Gewichts ( $\mu\text{g}$ ) wurde die DNA-haltige Gelprobe mit den Reagenzien gemäss dem Protokoll der Firma Qiagen, Hilden versetzt und die DNA aus dem Gel gewonnen.

#### **2.2.2.11 Ligation von DNA**

Den Vorgang der Verknüpfung des Vektormoleküls mit dem codierenden DNA-Sequenzabschnitt, den man klonieren möchte, bezeichnet man als Ligation.

Das Enzym, welches die Reaktion katalysiert und die Nukleinsäuremoleküle verknüpft, ist die DNA-Ligase.

Für die Ligationsreaktion wurden äquimolare Mengen von Vektor- und Insert-DNA mit 1  $\mu\text{l}$  Ligase, 2  $\mu\text{l}$  Ligatonspuffer und 2  $\mu\text{l}$  ATP versetzt und die Ansätze mit MQ-Wasser auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Es wurde für 16 Stunden bei 14°C ligiert.

### 2.2.2.12 Sequenzierung

Mit der Methode der DNA-Sequenzierung kann die genaue Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Sequenzabschnitt bestimmt werden.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem „Abi Prism<sup>®</sup> Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“-Kit der Firma Perkin Elmer und wurde entsprechend dem Protokoll durchgeführt.

### 2.2.2.13 Versuchsdurchführung

Im Rahmen der Vakzinierungsstudien wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, DNA-Vakzinierung 1 (DNAv1) und DNA-Vakzinierung 2 (DNAv2).

Im Experiment DNAv1 wurden die insgesamt 34 NOD-Mäuse in 2 Kontrollgruppen zu je 8 Tieren und in 3 plasmidbehandelte Gruppen zu je 6 Tieren aufgeteilt. In der Vakzinierungsstudie DNAv2 wurden die insgesamt 96 NOD-Mäuse zu jeweils 12 Tieren gruppiert.

Die orale Applikation mit Plasmid-DNA [Gruppen #2 bis #7] bzw. mit PBS [Kontrollgruppen #1] erfolgte mittels einer gebogenen Knopfkanüle. Die Vakzine wurde direkt im Oesophagus abgesetzt, um die Verabreichung exakt gleicher Mengen sicherzustellen.

Die orale Behandlung erfolgte zweimalig, jeweils 2 und 5 Tage vor der Behandlung mit Cyclophosphamid. Es wurden einmalig 250 mg/kg Cyclophosphamid intraperitoneal injiziert. In der zweiten Vakzinierungsstudie erfolgte eine zusätzliche dritte Applikation mit pDNA 2 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion. Einzige Ausnahme bildet die Gruppe #7 (DNAv2), die das TGF- $\beta$  als Reproduktion der DNAv1-Versuchsbedingungen nur zweimal appliziert bekam.

Nach weiteren 10 Tagen wurden die Mäuse getötet und die entsprechenden Gewebe und Proben für die Analysen gewonnen.

Tab. 2: Behandlungsprotokoll

GRUPPENBEZEICHNUNG		ANZAHL	BEHANDLUNG
DNAv1 = 34 NOD	#0 Kontrolle	n = 2 x 4 Tiere	Keine Behandlung
	#1 PBS	n = 2 x 4 Tiere	250µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#2 β-Aktin	n = 2 x 3 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#3 hICAM	n = 2 x 3 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#4 TGF-β	n = 2 x 3 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
DNAv2 = 96 NOD	#0 Kontrolle	n = 2 x 6 Tiere	Keine Behandlung
	#1 PBS	n = 2 x 6 Tiere	250µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#2 pcDNA3.1	n = 2 x 6 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#3 TGF-β (x3)	n = 2 x 6 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#4 hICAM	n = 2 x 6 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#5 mbHSP60-Fc	n = 2 x 6 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#6 mbHSP60	n = 2 x 6 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid
	#7 TGF-β (x2)	n = 2 x 6 Tiere	50µg pDNA in 200µl PBS 250mg/kg Cyclophosphamid

### 2.2.2.14 Zeitschema der Versuchsdurchführung



- \*TAG -5:       Sektion der Kontrollgruppen #0  
                  1. orale Vakzination aller Behandlungsgruppen [ #1 – #4 (DNAv1) bzw. - #7 (DNAv2)]
- \*TAG -2:       2. orale Vakzination aller Behandlungsgruppen [ #1 – #4 (DNAv1) bzw. - #7 (DNAv2)]
- \*TAG 0:        Injektion von Cyclophosphamid (250mg/Kg KGW)
- \*TAG +2:       3. orale Vakzination aller Behandlungsgruppen [ #1 – #7 (DNAv2)]
- \*TAG +10:     Sektion aller Behandlungsgruppen [ #1 – #4 (DNAv1) bzw. - #7 (DNAv2)]

### **2.2.2.15 Tiersektion und Materialaufbereitung**

Bei der Sektion der NOD-Mäuse wurde das Pankreas unmittelbar nach der Eröffnung des Abdomens isoliert.

Das Bauchspeichelorgan wurde mit einem Skalpellsschnitt längs in zwei anatomisch gleiche Hälften für die Histologie und die Bestimmung der Zytokingenexpression geteilt. Ausserdem wurde von jedem Versuchstier eine Blutprobe, Abschnitte des Jejunums, einzelne Peyer-Plaques und die Milz entnommen.

Für die Histologie wurde die Pankreashälfte in stickstoffgekühltem Isopentan schockgefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Das gefrorene Gewebe wurde in ein Cryo-Röhrchen überführt, nochmals in den flüssigen Stickstoff gegeben und schliesslich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.2.16 Anfertigung von histologischen Gefrierschnitten**

Für die histologischen Analysen wurden Gefrierschnitte am Kryostat CM3000 angefertigt. Das tiefgefrorene Gewebe wurde in speziellem Einbettmedium für Gefrierschnitte auf dem Objektisch fixiert und bei einer Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  bearbeitet.

Für die histologischen Untersuchungen wurden  $7\ \mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte angefertigt. Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden jeweils 3 Schnitte pro Ebene von insgesamt 10 bis 15 Ebenen auf Objektträger aufgezogen. Für die Insulinfärbungen sind jeweils 2 Schnitte pro Ebene von insgesamt 4 Ebenen auf Objektträger aufgezogen worden. Zwischen den Ebenen wurde jeweils zwischen  $100\ \mu\text{m}$  und  $120\ \mu\text{m}$  Pankreasgewebe verworfen.

Die aufgezogenen Pankreasgefrierschnitte wurden für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Fixierung der Gefrierschnitte erfolgte in einem 10-minütigem Acetonbad. Im Anschluss wurden die Präparate nochmals für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet, bevor sie einer speziellen Färbetechnik unterzogen wurden.

### **2.2.2.17 Hämatoxylin-Eosin-Färbetechnik**

Die Kernfärbung erfolgte in einem zehnmütigen Tauchbad mit einer gebrauchsfertigen Hämatoxylinfärbelösung nach Gill. Anschliessend wurden die Präparate für 10 Minuten unter fliessendem Leitungswasser gewaschen.

Die Zytoplasmafärbung erfolgte für 10 Sekunden in einer Eosinlösung mit einer Konzentration von 0,04%, welche wenige Sekunden vor Gebrauch mit einem Tropfen Eisessig versetzt wurde.

Die Objektträger wurden nochmals für wenige Sekunden unter Leitungswasser abgespült.

Die Präparate wurden nun für jeweils 1 Minute in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %, 80 %, 90 % und 96 % gewaschen. Abschliessend erfolgten 2 Tauchbäder mit Xylol für jeweils 2 Minuten. Die gefärbten Schnitte wurden mit Eukitt-Medium und Deckgläschen eingedeckt.

### **2.2.2.18 Auswertung der Langerhans-Inseln und Bestimmung des Insulitisgrades**

Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Pankreaspräparate wurden mit Hilfe eines Binokular-Lichtmikroskopes bei 100facher bzw. 250facher Vergrösserung einer semi-quantitativen Graduierungsanalyse unterzogen.

Es wurden für jedes Pankreas mindestens 10 Inseln ab einem Mindestdurchmesser von 50 µm für die Graduierung berücksichtigt.

Bewertungsparameter stellte das Ausmass der zelligen Infiltration der pankreatischen Inseln mit mononukleären Zellen dar. Die Infiltration wurde in 5 verschiedene Insulitisgrade eingeteilt, die wie folgt definiert wurden [12]:

Ist keine mononukleäre Infiltration festzustellen, handelt es sich um eine Insulitis vom Grad 0.

Grad 1 zeichnet sich durch eine geringgradige zellige Infiltration im periinsulären Randbereich aus. Die Infiltration beschränkt sich auf einzelne, wenige Zellen an einem Pol oder einem Randareal der Insel. Man spricht auch von einem fokalen Infiltrationsherd.

Vom Insulitisgrad 2 spricht man bei einer mittelgradigen Infiltration, die sich nicht nur auf den periinsulären Bereich bezieht, sondern sich auch intrainsulär ausdehnt.

Eine deutliches intrainsuläres Infiltrationsgeschehen bis zu einer Fläche von 20 % kennzeichnet eine Inselinfiltration vom Grad 3.

Die massivste Form der Infiltration, die ein Ausmass von 20 % übersteigt, wird als Grad 4 definiert.

#### **2.2.2.19 Subgraduierung der Inseln vom Grad 4**

Für den Vakzinierungsversuch DNAv1 wurde innerhalb der Grad 4-Insulitis-Gruppen eine weitere Subgraduierung vorgenommen.

Ausschließlich die bereits bewerteten Grad-4-Inseln wurden erneut nach dem prozentualen Anteil der zellinfiltrierten Fläche eingeteilt.

Eine zellige Infiltration von >20 bis 50 % der Gesamtinselgröße entspricht einem Sub-Insulitisgrad von 1. Liegt die Infiltration zwischen >50 und 80 %, handelt es sich um einen Sub-Insulitisgrad 2. Ein Sub-Insulitisgrad 3 liegt bei einer Infiltration von über 80 % vor. Für jede Versuchsgruppe wurde der Median berechnet. Jeder Einzelwert pro Versuchsgruppe entspricht dem mittleren Subinsulitisgrad aller ausgewerteten Grad-4-Inseln pro NOD-Maus.

#### **2.2.2.20 Immunhistologie und Insulinfärbung**

Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden 10 Minuten im Acetonbad fixiert und für mindestens weitere 30 Minuten luftgetrocknet.

Jeder Gewebeschnitt wurde mit einem histochemischen Fettstift auf dem Objektträger in engem Radius umrahmt, um ein Reaktionsfeld zu definieren.

Die einzelnen Reagenzien wurden direkt in diese Reaktionsfläche pipettiert, so dass der gesamte Schnitt von einem großzügigen Tropfen (ca. 25 µl/Schnitt) bedeckt wurde. Die Inkubationen erfolgten in einer geschlossenen Kunststoffwanne mit Objektträgerhaltevorrichtung. Die Wanne wurde mit feuchtem Zellstoff ausgelegt, um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden.

Die Objekte wurden für 10 Minuten in einem PBS-Tauchbad gewaschen. Das Blocken erfolgte für 30 Minuten mit einer frisch angesetzten Lösung aus PBS/BSA 2 % und Normalem Ziegenserum (15 µl/ml).

Die Gewebeschnitte wurden für 2 Stunden mit der primären Antikörperlösung, bestehend aus Meerschweinchen-Anti-Insulin-Antikörper und PBS/BSA 1 % in einem Volumenverhältnis von 1 : 150, inkubiert. Es folgten 2 Tauchbäder in PBS (x1) für je 5 Minuten.

Mit der sekundären Antikörperlösung (PBS (x1) + Biotinyliertes Anti-Meerschweinchen-IgG [5 µl/ml PBS] + Normales Maus Serum [15 µl/ml PBS]) wurden die Präparate für 45 Minuten inkubiert. Es folgten 2 weitere Tauchbäder in PBS für je 5 Minuten.

Die Detektionsreaktion erfolgt für 45 Minuten mit einem ABC-Peroxidase-Komplex (PBS (x1) + Reagenz A [10 µl/ml PBS] + Reagenz B [10 µl/ml PBS]).

Die Objekte wurden nochmals in einem PBS-Tauchbad für 10 Minuten gewaschen.

Für die Farbreaktion wurde ein Peroxidase-Substrat DAB (Zugabe von 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)/ml DAB kurz vor Gebrauch) auf die Gewebeschnitte aufgetragen.

Das Reagenz wurde zwischen 5 und 10 Minuten unter Beobachtung auf den Präparaten belassen. Sobald sich eine deutliche rotbraune Farbreaktion zeigte, wurde diese in einem 15 minütigen Tauchbad mit MQ-Wasser gestoppt.

Der Insulinfärbung schloss sich eine Hämatoxylinfärbung von 3 Minuten an. Die Objektträger wurden für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, 20 Sekunden in MQ-Wasser getaucht und anschliessend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %) für jeweils 1 Minute gewaschen. Es folgten 2 Bäder in Xylol für jeweils 2 Minuten, bevor die Objekte mit Eukitt-Medium eingedeckt wurden.

### **2.2.2.21 Auswertung der insulinpositiven Fläche der Langerhans-Inseln**

Die immunhistochemische Analyse der insulinpositiven Fläche erfolgte nur für die Insulitis vom Grad 4. Im mikroskopischen Bild stellte sich die insulinpositive Fläche durch eine rotbraune Färbung dar.

Die Präparate wurden mikroskopisch durchgemustert und für jede Grad-4-Insel mit einem Mindestdurchmesser von 50 µm wurde der prozentuale Anteil der insulinpositiven Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche der Insel bestimmt.

Aus den Einzelbestimmungen der Inseln wurde ein prozentualer Mittelwert pro NOD-Maus ermittelt.

Zur Überprüfung der Funktionalität der immunhistochemischen Insulinfärbung wurden Kontrollfärbungen ohne Verwendung des primären Guinea-Pig-Anti-Insulin-Antikörper durchgeführt. Bei diesen Kontrollobjekten war die Farbreaktion negativ.

### **2.2.2.22 Statistik**

Die statistischen Analysen wurden unter Anwendung der Statistikprogramme von Graph Pad Prism<sup>TM</sup> Version 3.0 durchgeführt.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanzen wurde der einseitige „Anova“-Test durchgeführt. Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5 % war ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).

Desweiteren wurde der zweiseitige „Fisher`s Exact“-Test für kleine Stichproben durchgeführt. Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5 % war ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).

Auch der „Newman-Keuls Multiple Comparison Test“ zeigte ein signifikantes Ergebnis, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5 % war ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Analyse des Cyclophosphamid-Modells**

NOD-Mäuse entwickeln einen spontanen Typ I Diabetes. Die Progression einer Insulitis von der frühen zur späten Krankheitsphase und die klinische Manifestation eines Diabetes entwickeln sich über viele Wochen und Monate. Durch die Behandlung mit Cyclophosphamid kann innerhalb weniger Tage bei der NOD-Maus die Entwicklung eines Diabetes synchronisiert und beschleunigt werden. Dieser induzierte Diabetes ermöglicht im Gegensatz zu der spontanen Krankheitsentstehung optimierte morphologische Studien.

##### **3.1.1 Charakterisierung der Inselentzündung bei NOD-Mäusen**

Die Auswertung und Einteilung der Langerhans-Inseln in verschiedene Insulitisgrade erfolgte mittels H.E.-gefärbter Gefrierschnitte von Pankreata der NOD-Mäuse.

Das Kriterium für die Einteilung von Grad 0 bis Grad 4 war die Infiltration der Langerhans-Inseln mit mononukleären Zellen. Dabei entspricht einem Insulitisgrad von 0 keine histologisch erkennbare Infiltration (vgl. Abb. 6). Der Insulitisgrad 1 definiert sich durch eine geringe Infiltration mit einzelnen mononukleären Zellen im periinsulären Randbereich (vgl. Abb. 7). Grad 2 infiltrierte Inseln zeigen eine zunehmende zellige Infiltration im periinsulären Bereich, die sich aber durchaus auch auf den intrainsulären Bereich ausdehnen kann (vgl. Abb. 8). Eine Insulitis vom Grad 3 ist durch ein deutliches Infiltrationsgeschehen im gesamten Inselbereich gekennzeichnet. Das Ausmass dieser Infiltration ist allerdings auf ein Areal von höchstens 20 % in Bezug auf die gesamte Inselfläche beschränkt (vgl. Abb. 9). Bei einer Insulitis vom Grad 4 lässt sich histologisch eine maximale Infiltration von über 20% der Gesamtinselgröße erkennen (vgl. Abb. 10).

INSULITISGRAD	AUSMAß DER ZELLINFILTRATION
Insulitisgrad 0	keine zellige Infiltration
Insulitisgrad 1	geringe periinsuläre Infiltration
Insulitisgrad 2	deutliche periinsuläre Infiltration
Insulitisgrad 3	deutliche Infiltration $\leq 20\%$ der Inselfläche
Insulitisgrad 4	deutliche Infiltration $> 20\%$ der Inselfläche

Tab. 3: Übersicht über die Einteilung der Inselentzündung in Insulitisgrade von Grad 0 bis Grad 4

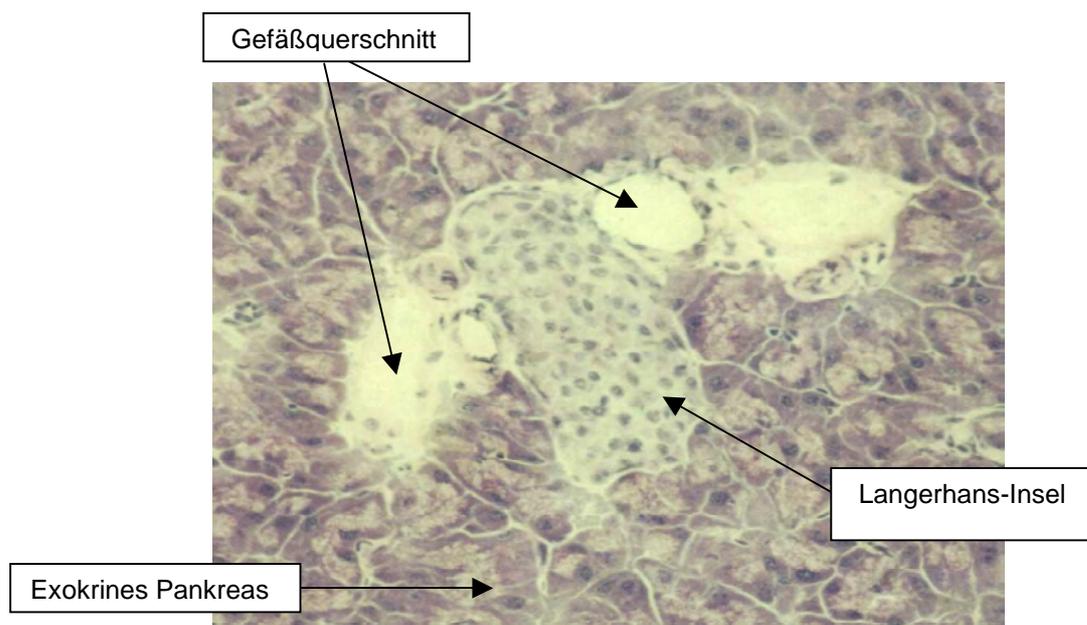


Abb. 6: Langerhans-Insel ohne Insulitis („Insulitis“ vom Grad 0). Die Langerhans-Insel liegt eingebettet im exokrinen Pankreasparenchym. Links und rechts sind Gefäße im Querschnitt sichtbar. In den abgegrenzten Inseln sind B-Zellen der häufigste Zelltyp, des weiteren kommen sogenannte A-Zellen, D-Zellen und PP-Zellen vor. Es liegen keine Infiltrate vor.

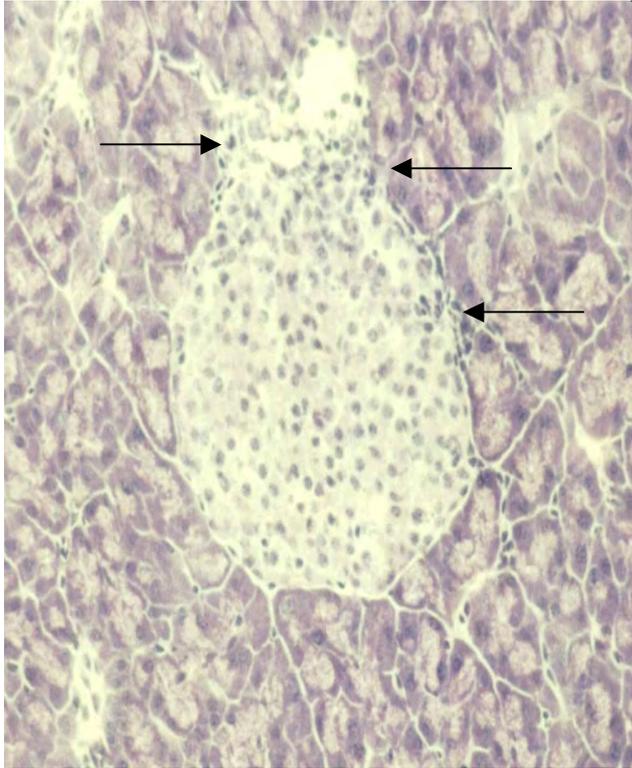


Abb. 7: Langerhans-Insel vom Insulitis-Grad 1.

Einzelne einwandernde mononukleäre Zellen zeigen sich periinsulär im rechten, oberen Randbereich als dunkle, punktförmige Infiltrate (vgl. Areale mit Pfeilmarkierung). Dieses Infiltrationsstadium zeigt eine schwache Insulitis vom Grad 1.

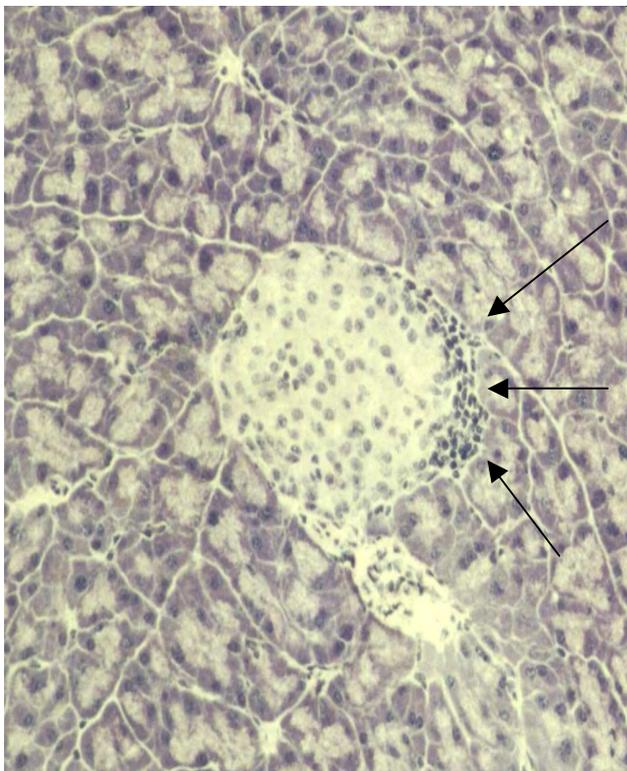


Abb. 8 Langerhans-Insel vom Insulitis-Grad 2.

Die periinsuläre Infiltration ist verstärkt am rechten Pol der Insel zu erkennen (vgl. Areale mit Pfeilmarkierung). Die fortschreitende Infiltration mit mononukleären Zellen im peripheren Randbereich der Insel zeigt eine Insulitis vom Grad 2.

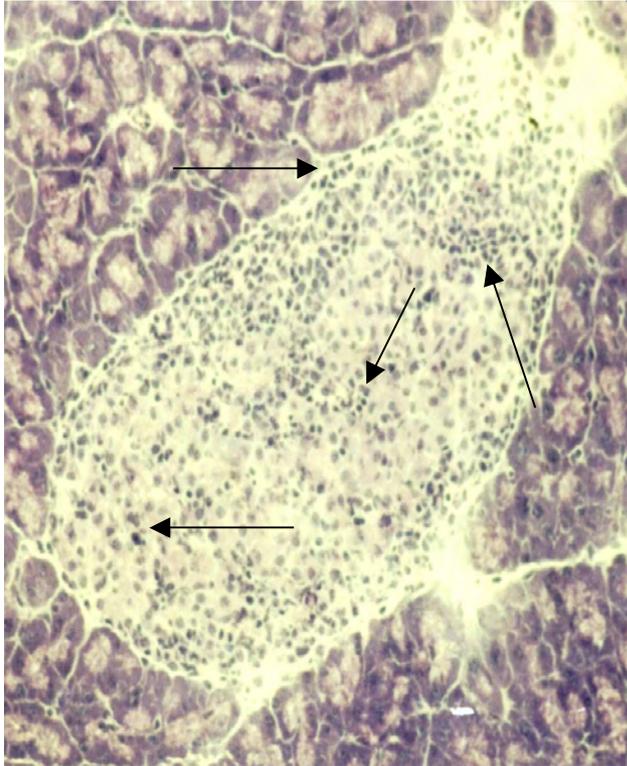


Abb. 9 Langerhans-Insel vom Insulitis-Grad 3.

Die Abbildung zeigt die weiter fortschreitende Migration der mononukleären Zellen. Die zelligen Infiltrate sind sowohl im periinsulären, als auch im intransulären Gewebe als dunkle Punkte zu erkennen (vgl. Areale mit Pfeilmarkierung). Dieses Stadium der Infiltration entspricht einer Grad-3-Insulitis.

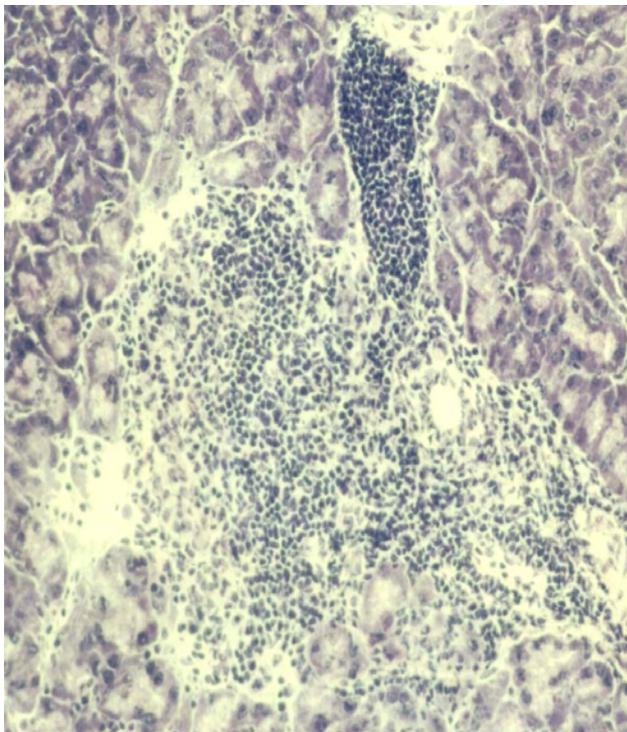


Abb. 10: Langerhans-Insel vom Insulitis-Grad 4.

Die gesamte Insel ist massiv mit mononukleären Zellen infiltriert. Dieses fortgeschrittene Stadium der Inselinfiltration zeigt eine Grad 4-Insulitis.

### 3.1.2 Progression der Insulitis im Cyclophosphamid-synchronisierten Modell der NOD-Maus

Die Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der histologischen Graduierungsanalyse der Langerhans-Inseln von NOD-Mäusen vor und 10 Tage nach Behandlung mit Cyclophosphamid. Es wurden zwei getrennte Studien mit  $\geq 8$  Tieren pro Gruppe durchgeführt. Beim statistischen Vergleich der unbehandelten Tiere mit den behandelten Tieren wurde eine Insulitis vom Grad 3 als kritischer Schwellenwert (SW) definiert. Unterhalb dieses Wertes ist die Infiltration mit Immunzellen nur um die Insel herum (Peri-Insulitis) zu beobachten. Oberhalb dieses kritischen Schwellenwertes ist eine massive intra-insuläre Infiltration zu beobachten. Dabei erstreckt sich die Infiltration über weite Bereiche der Inselareale. Unter Anwendung dieses Schwellenwertes als Kriterium wurden die statistischen Analysen mit dem Fisher`s Exact Test durchgeführt.

Die unbehandelten Tiere von Experiment 1 wiesen als Durchschnittswert pro Tier Insulitisgrade in einem Wertebereich zwischen Grad 0 und Grad 2,8 auf. Der Gruppenmedian dieser Durchschnittswerte lag bei Grad 1,2.

Beim Experiment 2 lag der Gruppenmedian der unbehandelten Tiere bei einem Insulitisgrad von 1,8. Die Einzelwerte bewegten sich in einem Wertebereich zwischen Grad 0,8 und Grad 2,8.

Nach Cyclophosphamidgaben zeigten die Tiere in Experiment 1 einen Anstieg des Insulitisgrades, mit einem Gruppenmedianwert von Grad 3,9. Für das Experiment 2 ergab sich ein fast identischer Gruppenmedian von Grad 4. Der Anstieg des durchschnittlichen Insulitisgrades nach der Gabe von Cyclophosphamid war signifikant ( $p < 0,0002$ ). Die Einzelwerte bewegten sich in einem Bereich zwischen Grad 3,8 und Grad 4. Lediglich ein singulärer Wert der DNAv2-Studie lag bei Grad 0,4. Zusammenfassend lässt sich nach der Cyclophosphamidapplikation ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,002$ ) der Insulitisgrade bei den NOD-Mäusen verzeichnen. Diese Ergebnisse repräsentieren den deutlichen Effekt des Cyclophosphamid auf das Infiltrationsgeschehen in den Langerhans-Inseln des Pankreas.

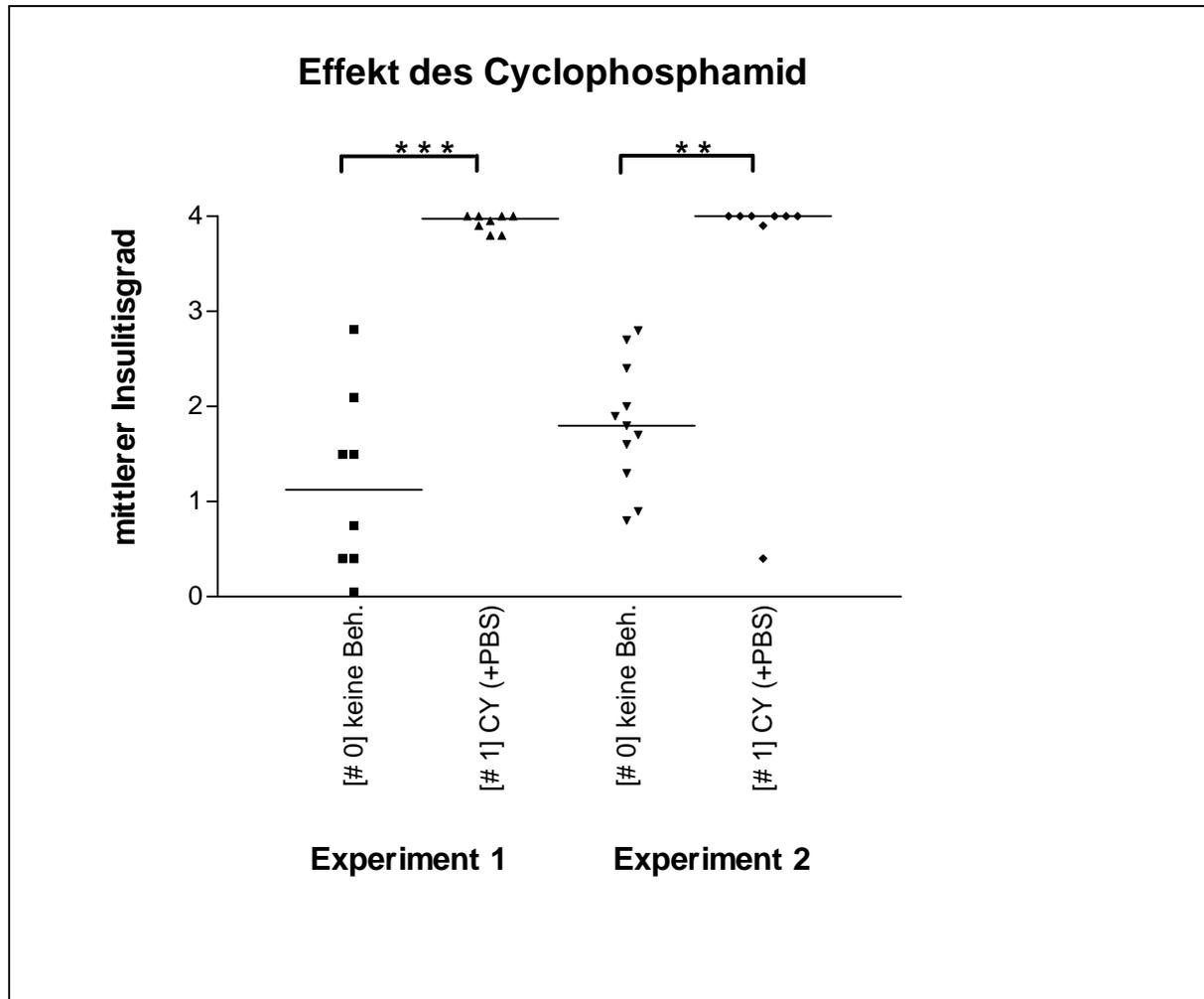


Abb. 11: Effekt von Cyclophosphamid auf die Insulitisentwicklung bei NOD-Mäusen. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse der Insulitisgraduierung der NOD-Mäuse aus zwei getrennten Experimenten. Die Ordinate trägt die Skalierung der mittleren Insulitisgrade pro Tier von 0 bis 4. Auf der Abzisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Bei den Versuchstieren handelt es sich um weibliche NOD-Mäuse. Die Tiere der Gruppen „# 0“ waren zum Zeitpunkt der Organentnahme 70 Tage alt. Die Tiere der Gruppen „# 0“ sind unbehandelt. Den 70 Tage alten NOD-Mäusen der Gruppen „# 1“ wurde einmalig 250 mg/kg Cyclophosphamid intraperitoneal injiziert. 10 Tage nach erfolgter Injektion wurde die Sektion durchgeführt. Jedes Symbol repräsentiert eine NOD-Maus und entspricht dem mittleren Insulitisgrad aller ausgewerteten Inseln pro NOD-Maus. Der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian. Das Experiment 1 zeigt beim Vergleich der Gruppe „# 0“ mit der Gruppe „# 1“ ein signifikant verschiedenes Ergebnis ( $p < 0,0002$ ). Das Experiment 2 zeigt beim Vergleich der Gruppe „# 0“ mit der Gruppe „# 2“ ebenfalls ein signifikant verschiedenes Ergebnis ( $p < 0,002$ ). Die hier dargestellten Experimente waren gleichzeitig Kontrollen für die Studien zur DNA-Vakzinierung (vgl. Abschnitt 3.3).

### 3.1.3 Charakterisierung der Insulin-positiven Inselzellen

Um die Aktivität der insulinproduzierenden B-Zellen im fortgeschrittenen Insulitisgeschehen zu untersuchen, wurden histologische Pankreasgefrierschnitte immunhistochemisch gefärbt. Die Insulinfärbung induziert eine bräunlich-rote Farbreaktion und die insulinpositive Fläche einer Langerhans-Insel wird erkennbar. Diese insulinpositiven Inselareale zeigen demnach physiologisch aktive B-Zellen. Inselareale, die aufgrund von massiver Infiltration mit mononukleären Zellen keine aktiven B-Zellen mehr aufweisen, zeigen keine positive Farbreaktion. Hier lässt sich ausschliesslich eine hohe Dichte an dunkel-violetten Infiltraten erkennen.

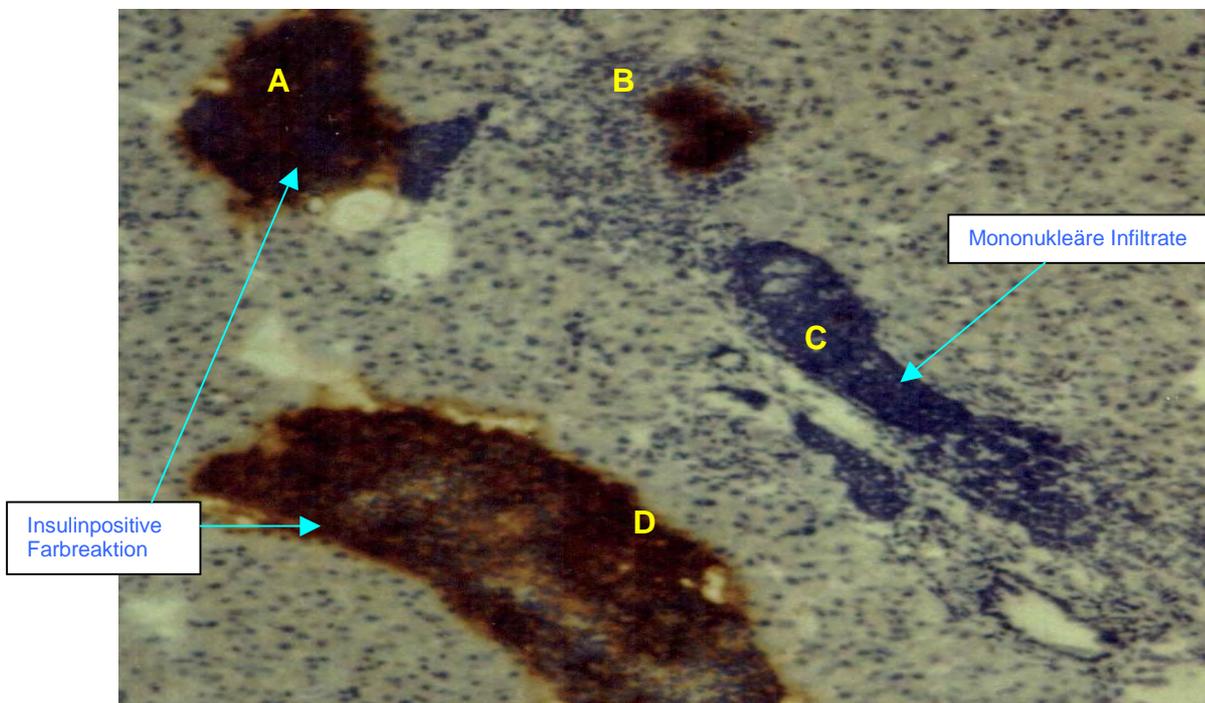


Abb. 12: Langerhans-Inseln vom Insulitis-Grad 4 nach immunhistochemischer Insulinfärbung.

Die Abbildung zeigt die immunhistochemische Insulinfärbung von 4 Langerhans-Inseln (A-D) des Pankreas. Die insulinpositiven Flächen sind als rot-braune Farbreaktionen sichtbar.

Die Inseln A und D weisen ein hohes Maß an Insulin auf. Fast das gesamte Inselparenchym zeigt eine positive rot-braune Farbreaktion. Die Insel B zeigt eine geringere Insulinpositivität. Nur ca. 25% der Inselfläche ist Insulin-positiv. Die Insel C zeigt aufgrund einer massiven Infiltration keine Farbreaktion mehr. Hier zeigen mononukleäre Infiltrate eine hohe Dichte (dicht gepackte, dunkel-violett gefärbte, punktförmige Zellkerne).

### 3.1.4. Einfluß von Cyclophosphamid auf die Insulinexpression in den Langerhans-Inseln von NOD-Mäusen

Die immunhistochemischen Insulinanalysen des Experimentes 1 (Abb. 13) zeigen die Expression von Insulin in den Langerhans Inseln bei Cyclophosphamid-behandelten NOD-Mäusen (Gruppe „# 1“) und unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe „# 0“). Die Inseln wurden in Bezug auf den prozentualen Anteil ihrer insulinpositiven Fläche bewertet. Die unbehandelten NOD-Mäuse hatten einen Gruppenmedian von 90%. Unter Cyclophosphamid sank der Gruppenmedian signifikant auf 26% ( $p < 0,0006$ ).

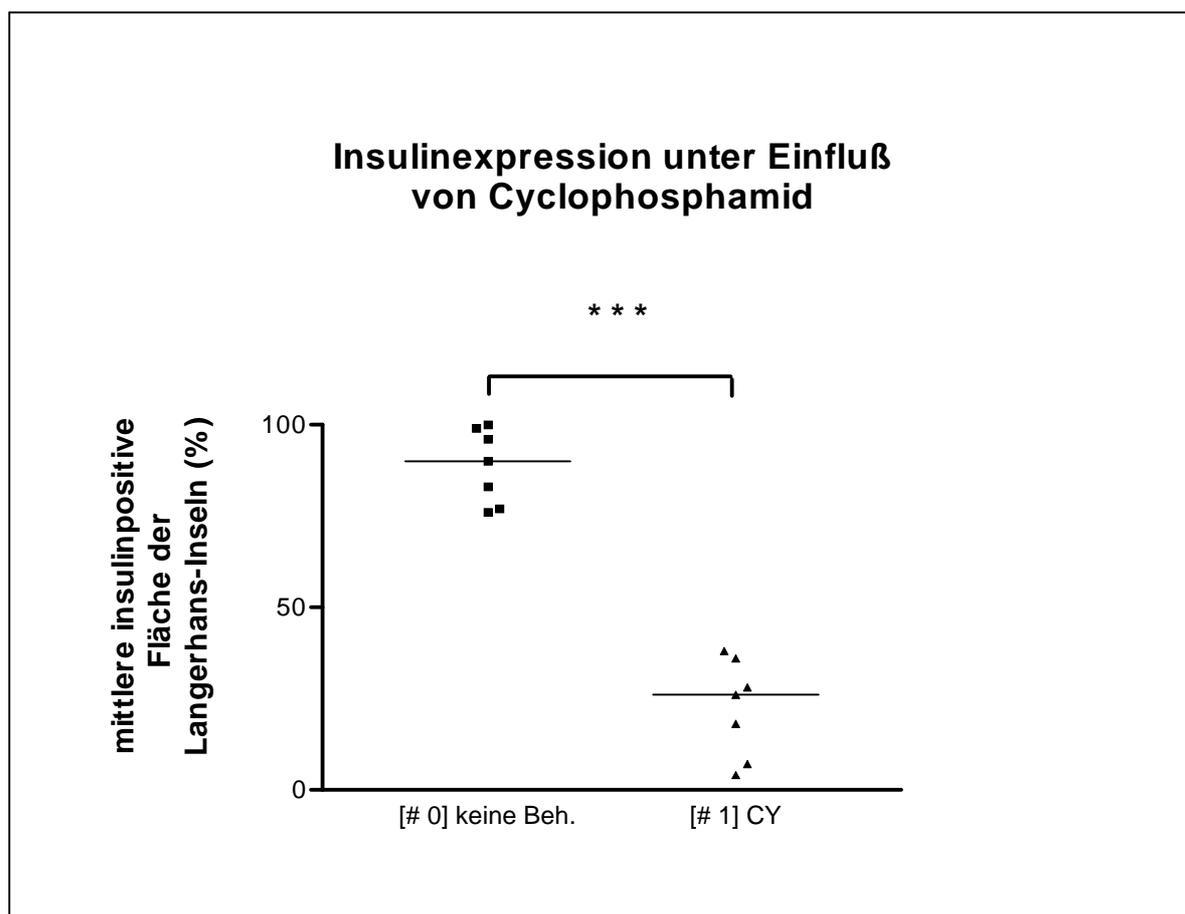


Abb. 13: Einfluss von Cyclophosphamid auf die Insulinexpression in den Langerhans-Inseln von NOD-Mäusen (Experiment 1). Es wurde der prozentuale Anteil der durch eine immunhistochemische Farbreaktion dargestellten insulinpositiven Fläche für sämtliche Inseln bestimmt. Die Ordinate trägt die Skalierung der Insulinpositivität in Prozent. Auf der Abzisse sind die beiden Versuchsgruppen aufgetragen. Jedes Symbol repräsentiert eine NOD-Maus. Der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian. Die aufgeführten Einzelwerte entsprechen jeweils dem Mittelwert pro NOD-Maus. Die Ergebnisse der unbehandelten Gruppe „# 0“ zu der Behandlungsgruppe „# 1“ sind signifikant verschieden ( $p < 0,0006$ ).

### **3.2 Zytokingenexpression im Darmimmunsystem während der Cyclophosphamid-induzierten Krankheitsentwicklung**

Wegen der engen pathophysiologischen Assoziation von Darmimmunsystem und Inseleentzündung (siehe Einleitung) wurde geprüft, ob die beschleunigte und synchronisierte Progression der Insulitis parallele Veränderungen im Darm im Sinne einer inflammatorischen Reaktion bewirkte. Als Parameter einer proinflammatorischen Veränderung im Darmimmunsystem diente das TH1/TH2-Zytokingenexpressionsmuster. Hierzu wurden die mRNA-Mengen für IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und TGF- $\beta$  im proximalen Dünndarm mittels semi-quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Erhebungen zur  $\beta$ -Aktin-Expression erlauben die Normierung der mRNA-Messungen und ermöglichen so die Vergleichbarkeit der einzelnen Parameter miteinander.

Die Graphen zeigen jeweils die Ergebnisse der mRNA-Messungen pro Parameter. Auf der Abzisse sind die 3 Untersuchungsgruppen aufgeführt; die unbehandelte Gruppe 0D [Tag 0], die Gruppe 3D [3 Tage] und die Gruppe 10D [10 Tage] nach der Cyclophosphamid-Injektion. Jeder Einzelwert entspricht einem Versuchstier. Die mRNA-Mengen sind auf der Ordinate in „arbitrary units“ [a.u.] aufgeführt. Hierbei wurde die via RT-PCR definierte mRNA-Menge von  $\beta$ -Aktin ab 1 gesetzt und darauf die Menge an Zytokin mRNA kalibriert (Quotient aus PCR-Signalen für Zytokin und  $\beta$ -Aktin).

#### **3.2.1 mRNA-Analyse von IFN- $\gamma$**

Die mRNA-Analysendaten von IFN- $\gamma$  (Abb. 14) schwankten am Tag 0 zwischen 30 a.u. und 110 a.u.. 3 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion kam es, mit Ausnahme eines erhöhten Einzelwertes von 107 a.u., zu einem Abfall der mRNA-Mengen. Eliminert man diesen erhöhten Einzelwert ergibt sich statistisch kein signifikantes Ergebnis für die mRNA-Mengen an Tag 3. Der Gruppenmedian von Tag 0 war mit 50 a.u. doppelt so groß wie am Tag 3 mit 25 a.u.. 10 Tage nach der Applikation zeigten die Messungen einen Anstieg auf ein im Durchschnitt höchstes Niveau von 65 a.u.. Die gemessenen Unterschiede sind nicht signifikant.

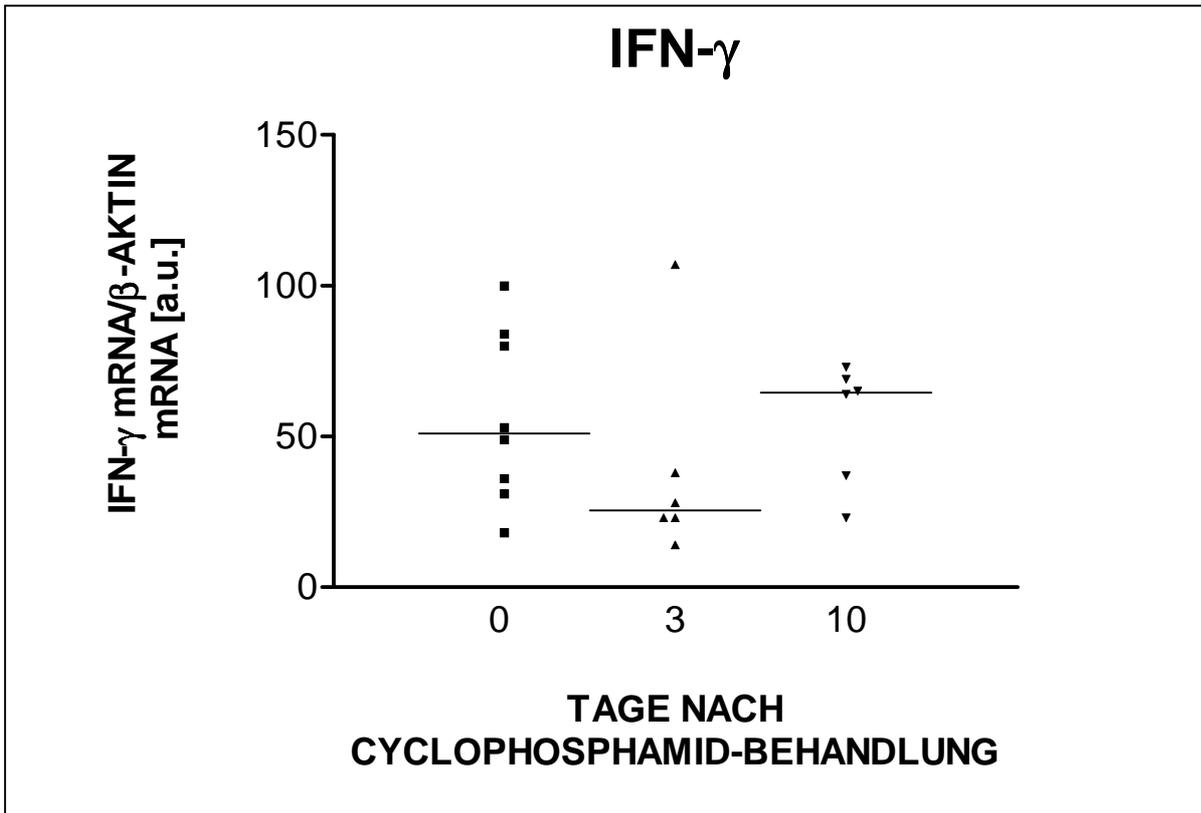


Abb.14: Analyse des IFN- $\gamma$  mRNA-Gehalts aus Dünndarmgewebe von NOD-Mäusen. Die Graphik zeigt die Ergebnisse der mRNA-Messungen mittels semi-quantitativer RT-PCR für das Zytokin IFN- $\gamma$  für die unbehandelten Tiere und 3 und 10 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, der waagerechte Strich beschreibt den Median.

### 3.2.2 mRNA-Analyse von TNF- $\alpha$

Für das TNF- $\alpha$  (Abb. 15) zeigten die Messdaten am Tag 0 eine geringe Streuung. Die Einzelwerte lagen zwischen 34 a.u. und 85 a.u. und der Median bei 54 a.u.. 3 Tage nach der Cyclophosphamidbehandlung sah man eine größere Streuung der Einzelwerte von 7 a.u. bis 144 a.u.. Man erkennt zwei gleichgroße Messbereiche. Der eine Messbereich lag deutlich über den Werten von Tag 0 und der andere Bereich war niedriger als die Werte von Tag 0. Der Median lag am Tag 3 bei 70 a.u.. 10 Tage nach der Behandlung lag der höchste Messwert bei 233 a.u., die restlichen erhobenen Daten zwischen 21 a.u. bis 80 a.u.. Der Median beträgt 66 a.u..

Zusammenfassend waren die Mediane von TNF- $\alpha$  über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant in einem engen Bereich zwischen 50 a.u. und 70 a.u.. Tendenziell war ein geringer Anstieg der mRNA-Mengen bei deutlich größerer Streuung der Behandlungsgruppen 3D und 10D gegenüber der Kontrollgruppe 0D zu verzeichnen. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

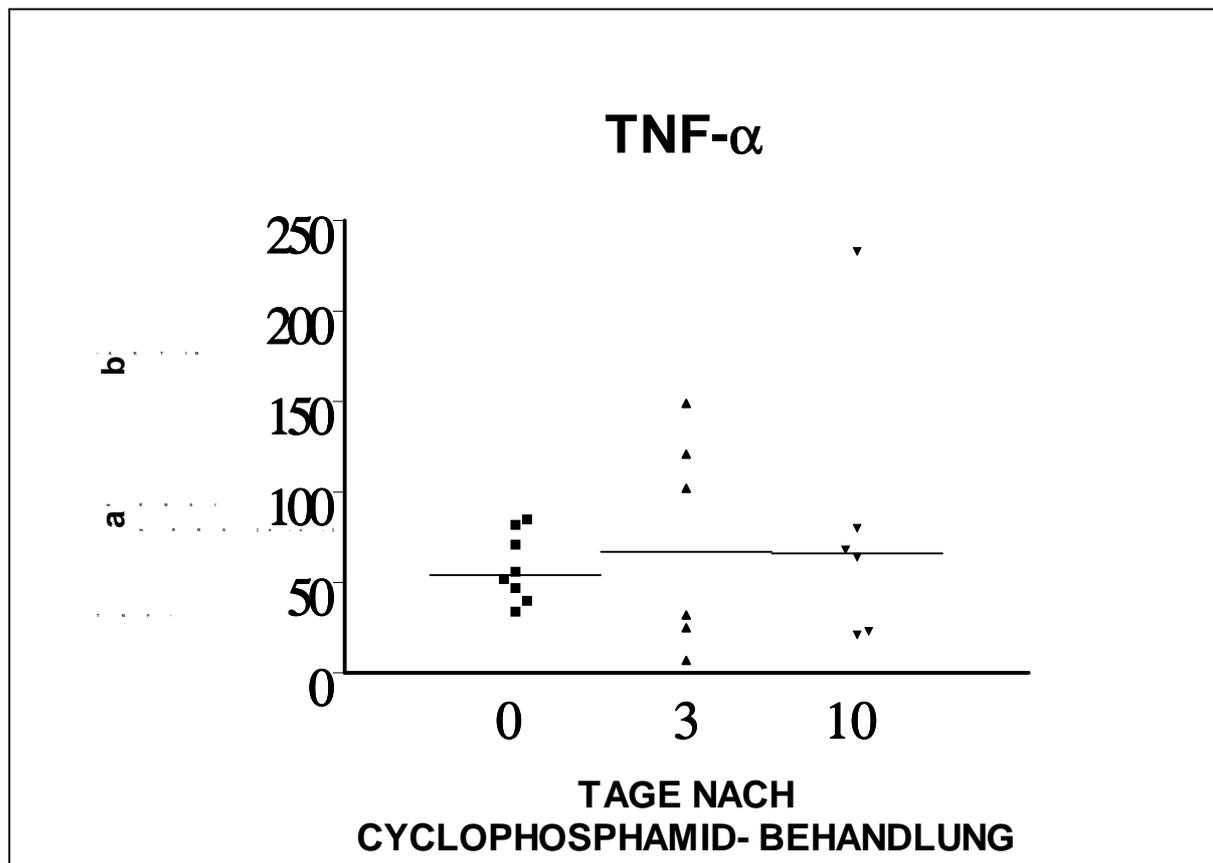


Abb. 15: Analyse des TNF- $\alpha$  mRNA-Gehalts aus Dünndarmgewebe von NOD-Mäusen. Die Graphik zeigt die Ergebnisse der mRNA-Messungen mittels semi-quantitativer RT-PCR für das Zytokin TNF- $\alpha$  für die unbehandelten Tiere und 3 und 10 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, der waagerechte Strich beschreibt den Median.

### 3.2.3 mRNA-Analyse von TGF- $\beta$

Für TGF- $\beta$  (Abb. 16) lagen die Daten der unbehandelten Tiere in einem Bereich zwischen 6 a.u. und 22 a.u.. 3 Tage nach der Cyclophosphamidgabe lagen die Einzelwerte zwischen 9 a.u. und 26 a.u.. 10 Tage nach der Behandlung lagen die Einzelwerte zwischen 7 a.u. und 25 a.u.. Innerhalb der drei Gruppen ist eine starke Streuung der Einzelwerte festzustellen. Die unbehandelte 0D-Gruppe hatte einen

Medianwert von 17,5 a.u.. Derjenige der 3D-Gruppe lag bei 14,5 a.u. und 10 Tage nach Cyclophosphamid befand sich der Median bei 15 a.u.. Die beiden Behandlungsgruppen zeigten somit einen fast identischen Median-Wert. Im Verlauf der Studie von Tag 0 bis Tag 10 senkt sich der Median.

Da sich die mRNA-Mengen von TGF- $\beta$  bei allen 3 Gruppen in einem ähnlichen Messbereich befanden und die Einzelwerte weit gestreut waren, zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.

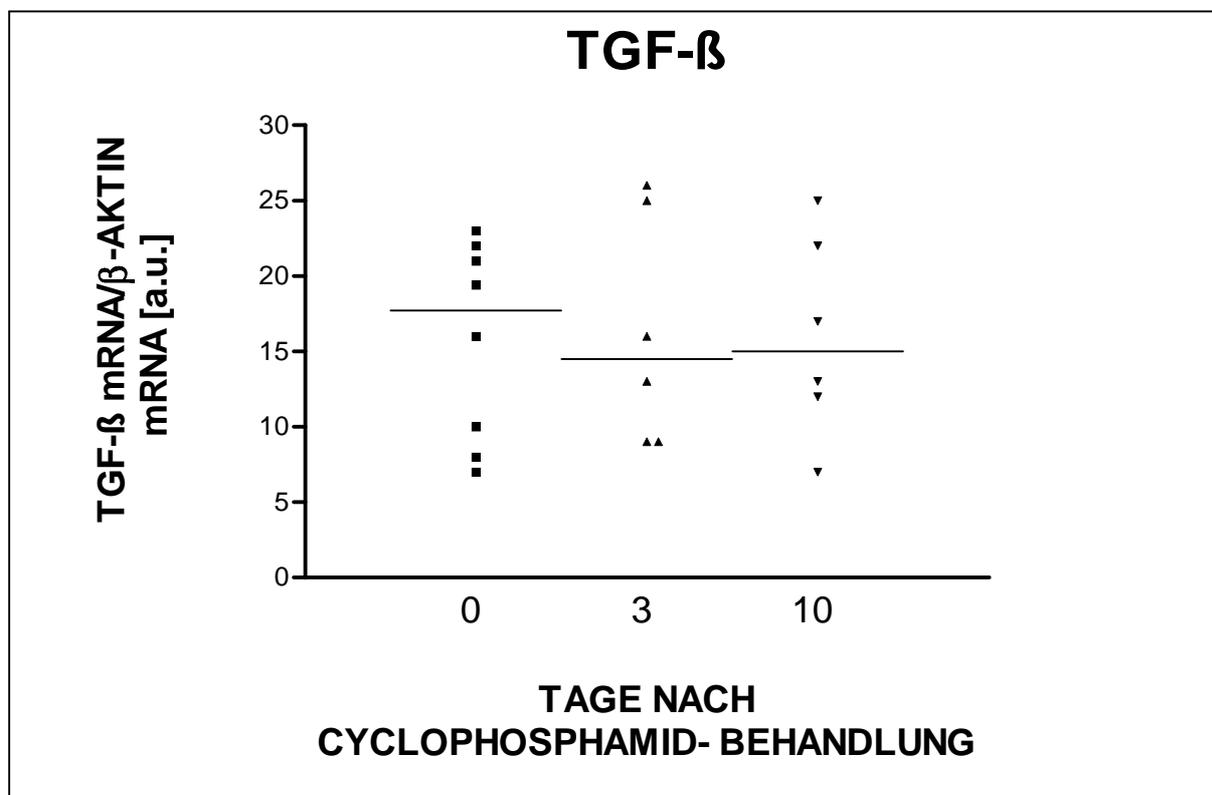


Abb. 16: Analyse des TGF- $\beta$  mRNA-Gehalts aus Dünndarmgewebe von NOD-Mäusen. Die Graphik zeigt die Ergebnisse der mRNA-Messungen mittels semi-quantitativer RT-PCR für TGF- $\beta$  für die unbehandelten Tiere und 3 und 10 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, der waagerechte Strich beschreibt den Median.

### 3.2.4 mRNA-Analyse von IL-10

Die Untersuchungen zum IL-10 (Abb. 17) lassen sinkende mRNA-Mengen beim Vergleich der unbehandelten Gruppe mit den cyclophosphamidbehandelten Tieren erkennen. Am Tag 0 lagen die Einzelwerte in einem Bereich zwischen 19 a.u. und 63 a.u. Am Tag 3 lagen die Daten in einem engen Messbereich zwischen 13 a.u. und 25 a.u.. 10 Tage nach der Behandlung ergaben sich Messdaten zwischen 13 a.u. und 24 a.u. Das Absinken des Gruppenmedians innerhalb 3 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion von 25 a.u. auf 15 a.u. ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Nach 10 Tagen lag der Gruppenmedian bei 20 a.u. ( $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend zeigt nur das Zytokin IL-10 3 Tage und 10 Tage nach der Injektion von Cyclophosphamid signifikant veränderte Ergebnisse ( $p < 0,05$ ). Für IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  lassen sich keine signifikanten Unterschiede beobachten.

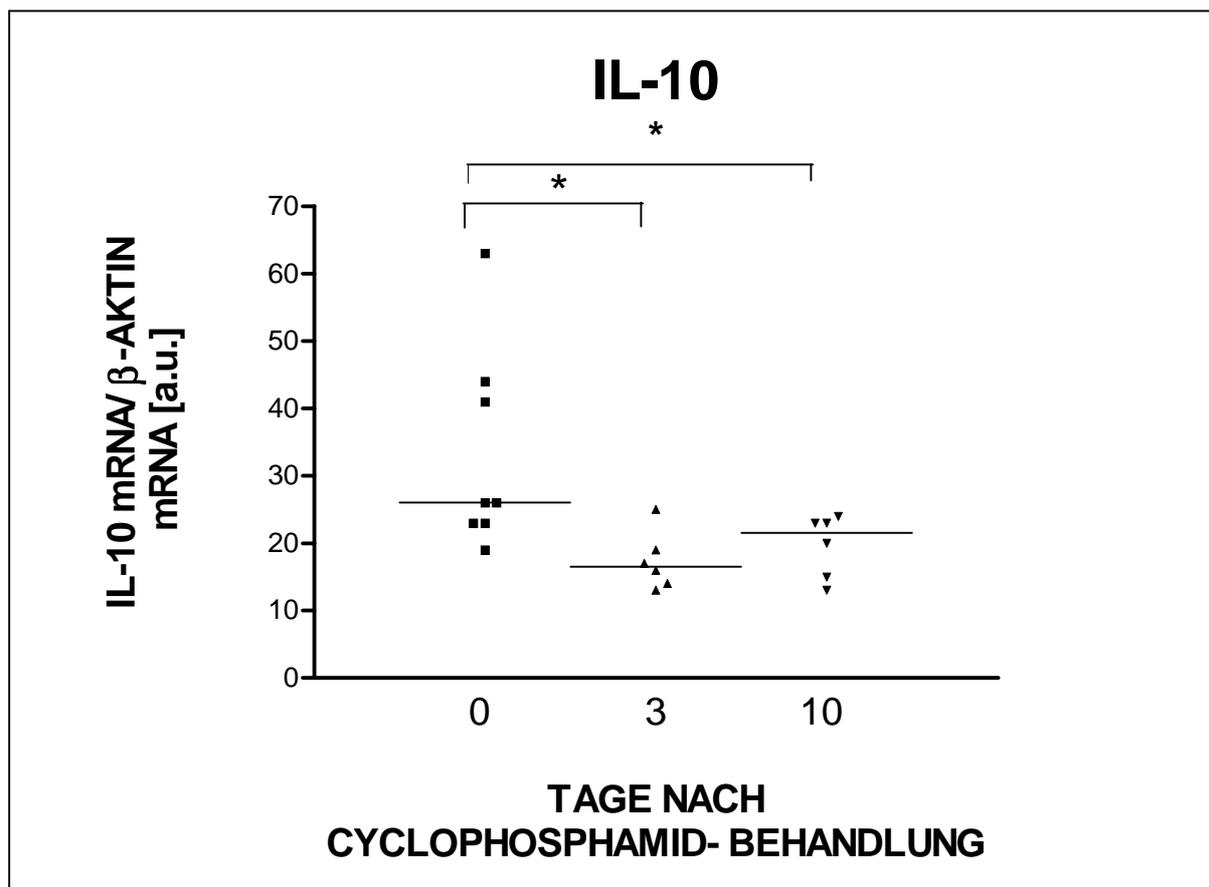


Abb. 17: Analyse der IL-10 mRNA-Gehalts aus Dünndarmgewebe von NOD-Mäusen. Die Graphik zeigt die Ergebnisse der mRNA-Messungen mittels semi-quantitativer RT-PCR für IL-10 ( $p < 0,05$ ) für die unbehandelten Tiere und 3 Tage und 10 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian.

### 3.2.5 Änderung der IL-10-Expression und TGF- $\beta$ -Expression unter Cyclophosphamid-Behandlung

Das Verhältnis der Expression zwischen bestimmten Zytokinen (Abb. 18 und Abb. 19) ergibt zusätzlich einen Hinweis auf die Th1/Th2-Immunbalance. Die Abb. 18 zeigt das Expressionsverhältnis zwischen den Zytokinen INF- $\gamma$  und IL-10. 10 Tage nach der Cyclophosphamidbehandlung verschob sich das Th1-/Th2-Verhältnis in Richtung INF- $\gamma$ . Bei den unbehandelten NOD-Mäusen lag der Gruppenmedian bei 18 und 3 Tage nach der Injektion von Cyclophosphamid bei 19. 10 Tage nach erfolgter Behandlung stieg der Gruppenmedian auf einen Wert von 28. Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

Die Abb. 19 zeigt das Expressionsverhältnis zwischen den Zytokinen INF- $\gamma$  und TGF- $\beta$ . Für die unbehandelten NOD-Mäuse ergaben die Messdaten einen Gruppenmedian von 4,4 am Tag 0. Nach erfolgter Cyclophosphamidinjektion sank der Gruppenmedian nach 3 Tagen auf 2 und stieg 10 Tage nach der Behandlung auf 3. Nach der Verabreichung von Cyclophosphamid verschob sich das Th1/Th2-Verhältnis in Richtung TGF- $\beta$ . Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

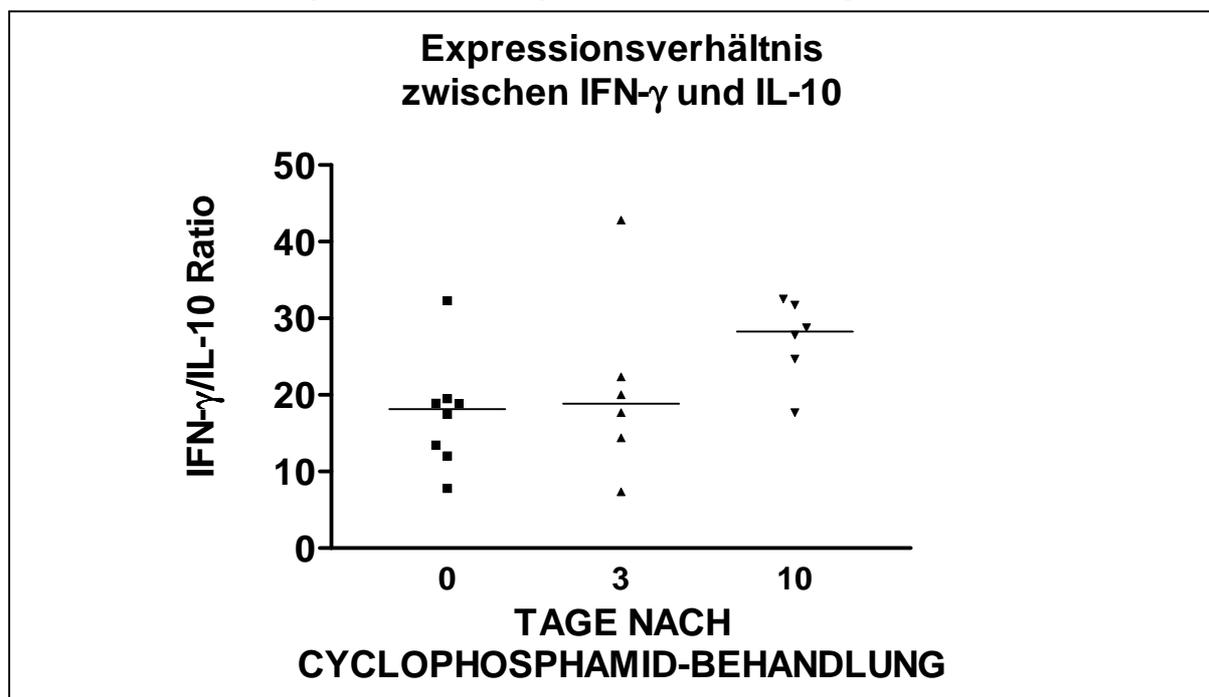


Abb. 18: Vergleich der INF- $\gamma$ - und IL-10- Zytokingenexpression aus identischem Untersuchungsmaterial (Dünndarmgewebe von NOD-Mäusen). Die Grafik zeigt das Expressionsverhältnis zwischen INF- $\gamma$  und IL-10 für die unbehandelten Tiere und 3 Tage sowie 10 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian.

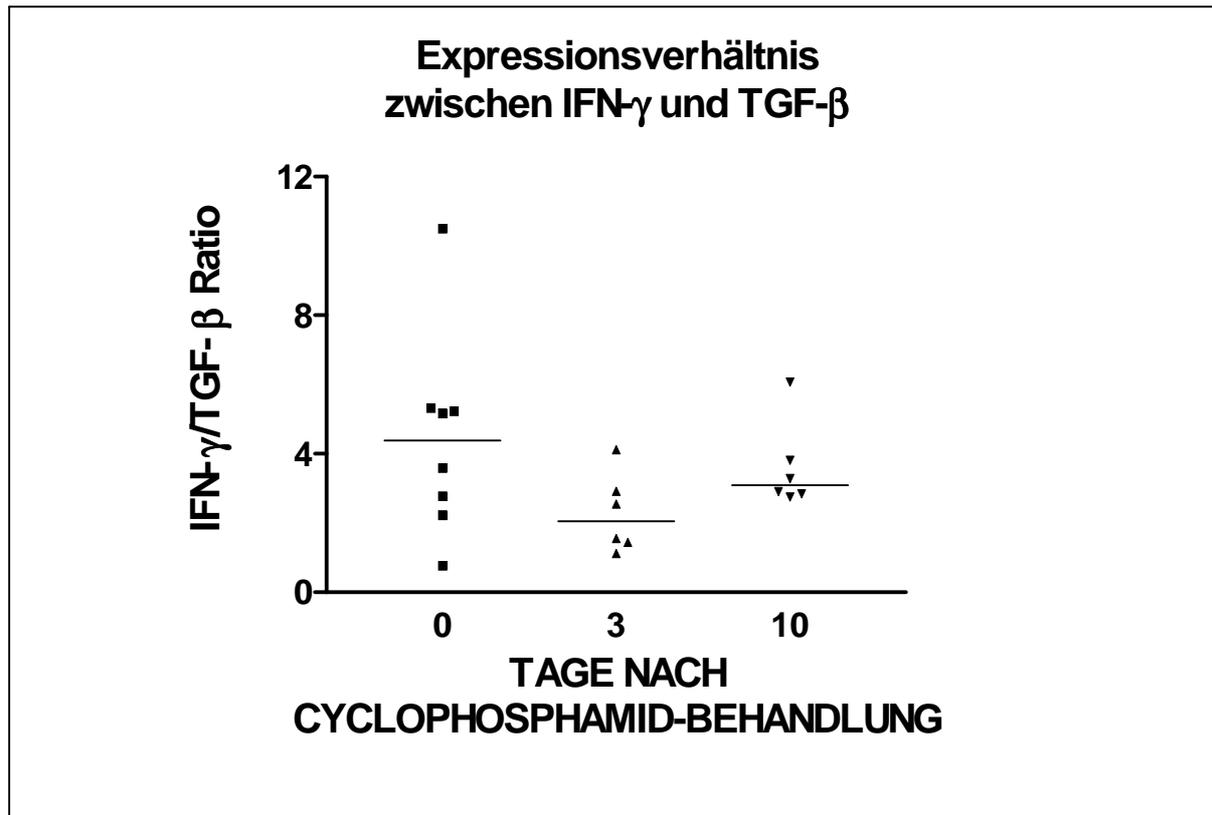


Abb. 19: Vergleich der IFN- $\gamma$ - und TGF- $\beta$ - Zytokingenexpression aus identischem Untersuchungsmaterial (Dünndarmgewebe von NOD-Mäusen). Die Grafik zeigt das Expressionsverhältnis zwischen IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  für die unbehandelten Tiere und 3 Tage sowie 10 Tage nach der Cyclophosphamidinjektion. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian.

### **3.3 Orale Vakzinierung von NOD-Mäusen mit Plasmid-DNA-Konstrukten**

In diesem Teil der Arbeit wurde geprüft, ob der oben beschriebene Verlauf der Cyclophosphamid-induzierten Insulitisprogression durch Immunmodulatoren des Darimmunsystem mittels Plasmid-DNA-Konstrukten beeinflusst werden kann.

#### **3.3.1 Modulation des Infiltrationsgeschehen durch orale DNA-Vakzine**

Die graphischen Darstellungen (Abb. 20 und Abb. 21) der Untersuchungsergebnisse der DNAv1-Studie (Experiment 1) und DNAv2-Studie (Experiment 2) zeigen die Insulitisentwicklung nach oraler Vakzinierung mit DNA-Konstrukten.

Die histologischen Befunde der ersten Vakzinierungsstudie DNAv1 (Abb. 20) ergaben eine signifikante Verstärkung der Insulitis nach erfolgter Verabreichung von Cyclophosphamid. Auch bei den mit Plasmiden behandelten Tieren kam es zu einer massiven Infiltration der Inseln. Der Median für die  $\beta$ -Aktin-Fc- und für die TGF- $\beta$ -behandelten Tiere lag bei Grad 3,8, für die hICAM-behandelten Tiere bei Grad 4.

Die Insel der zweiten Vakzinierungsstudie DNAv2 (Abb. 21) wiesen ebenfalls hohe Infiltrationsgrade auf. Der Median aller Behandlungsgruppen lag in einem Wertebereich zwischen Grad 3,6 und 4. Bei der Betrachtung der Einzeltiere sah man für ‚pcDNA3.1‘ einen einzelnen Wert bei Grad 2,1, während alle restlichen NOD-Mäuse oberhalb von Grad 3,6 lagen.

Bei der TGF- $\beta$ -Gruppe zeigten 2 Tiere ein Infiltrationsgeschehen vom Grad 1,9 bzw. Grad 2,3. Für das ‚hICAM‘ lagen 2 Werte bei Grad 2,4 bzw. 2,8. Ein einzelnes mbHsp60-Fc-behandeltes Tier zeigte einen Insulitisgrad von 2,9.

Alle übrigen NOD-Mäuse befanden sich unabhängig von der durchgeführten Behandlung oberhalb von Grad 3. Somit wurde durch die Behandlung mit den jeweiligen Plasmid-Konstrukten keine signifikanten Veränderungen des Cyclophosphamid-induzierten Insulitisgeschehen bewirkt.



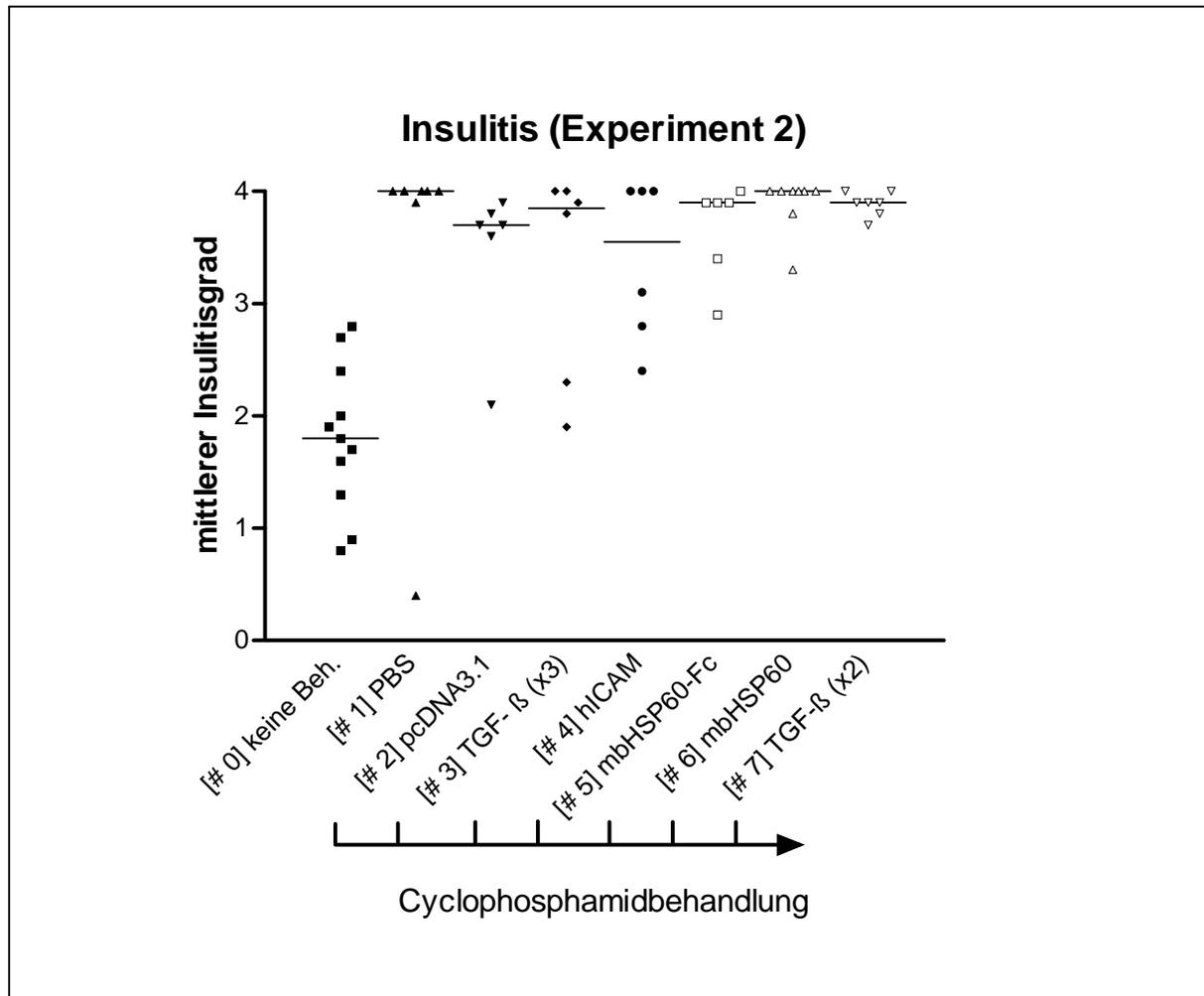


Abb. 21: Einfluss der Plasmid-DNA-Vakzinierung auf die Cyclophosphamid-induzierte Insulitisprogression. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse der Insulitisgraduierung der NOD-Mäuse aus der Vakzinierungsstudie DNAv2 (Experiment 2). Die Ordinate trägt die Skalierung der Insulitisgrade von 0 bis 4. Auf der Abzisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen.

Die Tiere der Gruppe „# 0“ sind unbehandelt. Die Tiere der Gruppen „# 1“ bis „# 7“ sind einmalig mit 250 mg/kg Cyclophosphamid intraperitoneal behandelt worden. Den Tieren der Kontrollgruppe „# 1“ wurde gemäss Behandlungsschema PBS oral appliziert. Die Behandlungsgruppen „# 2“ bis „# 7“ wurden oral mit Plasmid-DNA gemäss Behandlungsschema vakziniert. Jeder aufgeführte Einzelwert entspricht dem mittleren Insulitisgrad aller ausgewerteten Inseln pro NOD-Maus. Der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian.

### 3.3.2 Subgraduierung der Langerhans-Inseln vom Grad 4

Die graphische Darstellung (Abb. 22) zeigt die Insulitissubgrade der analysierten Grad-4-Inseln der DNav1-Studie (Experiment 1). Die Ergebnisse betreffen die Behandlungsgruppen „# 1“ bis „# 4“. Die unbehandelte Kontrollgruppe „# 0“ blieb unberücksichtigt, da keine Inseln mit einer Infiltrationsintensität vom Grad 4 auftraten. Für eine zusätzliche deskriptive Analyse wurden ausschließlich die Grad-4-Inseln nach ihrem prozentualen Anteil der zellinfiltrierten Fläche eingeteilt. Dabei entspricht eine zellige Infiltration von >20 % bis 50 % der Gesamtinselgröße einem Sub-Insulitisgrad von 1. Liegt die Infiltration zwischen >50 % und 80 %, handelt es sich um einen Sub-Insulitisgrad 2 und bei einer Inselinfiltration von über 80 % handelt es sich um einen Sub-Insulitisgrad 3.

Der Vergleich der Mediane aller Gruppen zeigt einen homogenen Wertebereich.

Die PBS-Gruppe und die hICAM-Gruppe zeigten einen identischen Wert von Subgrad 2,8. Die Einzelwerte der PBS-Tiere befanden sich zwischen Subgrad 2,0 und 3,0; die Einzelwerte der hICAM –Tiere zwischen Subgrad 2,6 und 3,0.

Der Gruppenmedian der  $\beta$ -Aktin-Tiere war mit Subgrad 2,9 der Höchste. Der Einzelwertebereich lag von Subgrad 2,5 bis Subgrad 3,0.

Den niedrigsten Gruppenmedian von 2,45 bildete die TGF- $\beta$ -Gruppe. Die Einzelwerte lagen zwischen Subgrad 2,0 und 2,9.

Zusammenfassend lässt der Vergleich der Subgraduierung der Insulitis keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen erkennen.

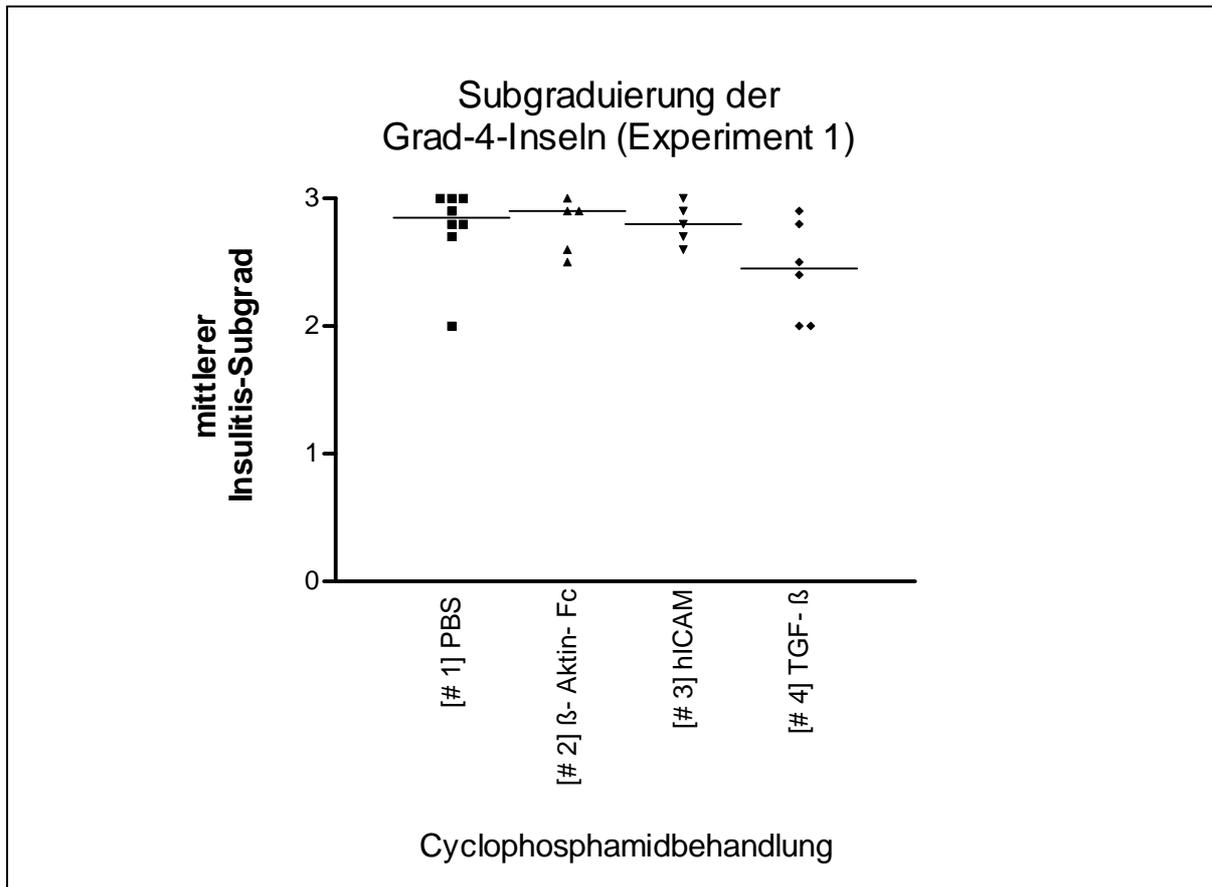


Abb. 22: Subgraduierung der Grad-4-Insulitis (Studie DNAv1/ Experiment 1). Ausschliesslich die bereits analysierten Grad-4-Inseln der NOD-Mäuse der Vakzinierungsstudie DNAv1 wurden einer weiteren Subgraduierung unterzogen. Die Ordinate trägt die Skalierung der Insulitisgrade von Subgrad 0 bis 3. Auf der Abzisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgeführt. Jeder aufgeführte Einzelwert entspricht dem mittleren Subinsulitisgrad aller ausgewerteten Grad-4-Inseln pro NOD-Maus. Der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian.

### 3.3.3 Immunhistochemische Analyse der Insulinproduktivität

Für die immunhistochemischen Insulinanalysen der Vakzinierungsstudie DNAv1 wurden alle Inseln in Bezug auf den prozentualen Anteil ihrer insulinpositiven Fläche bewertet (Abb. 23).

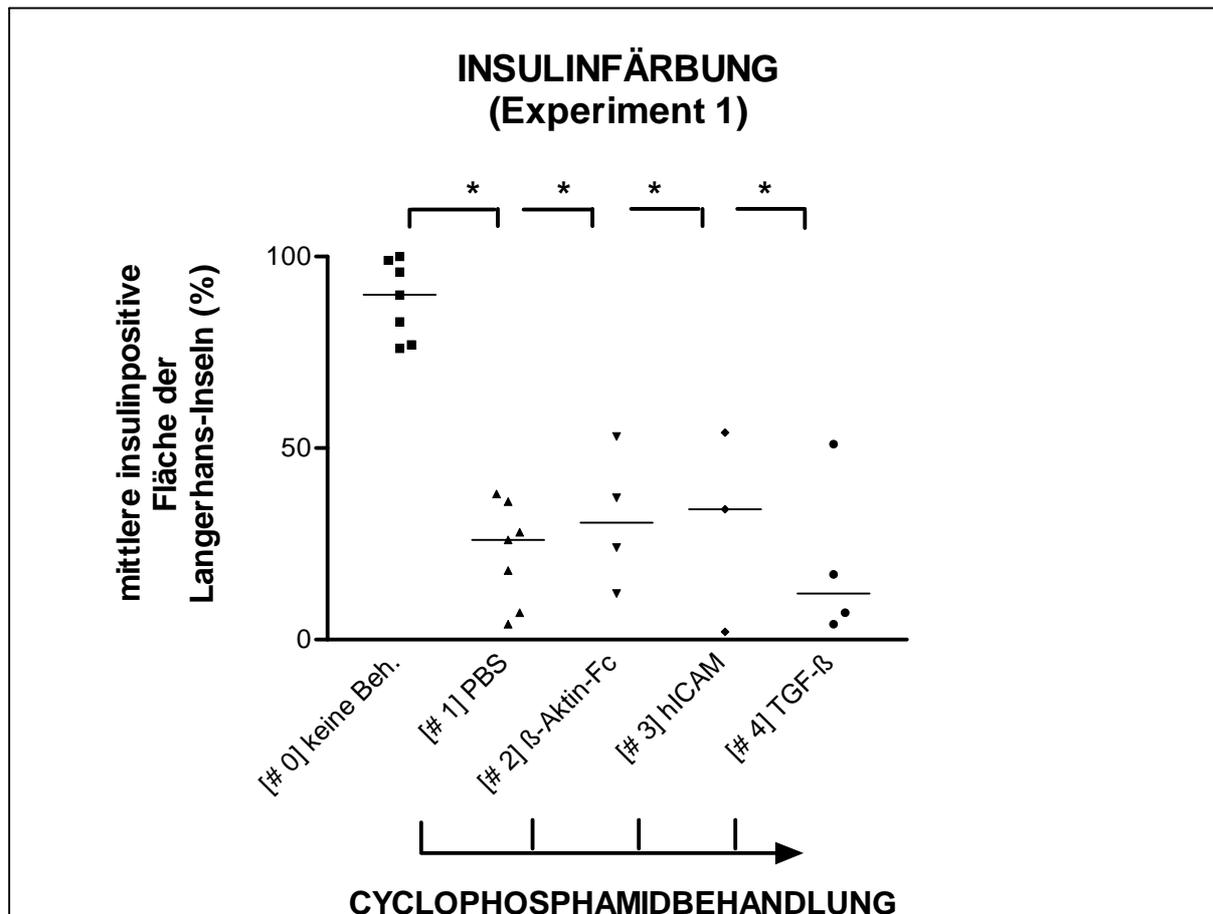


Abb. 23: Analyse der immunhistochemischen Insulfärbung der Langerhans-Inseln der Vakzinierungsstudie DNAv1 (Experiment 1). Es wurde der prozentuale Anteil der durch eine Farbreaktion dargestellten insulinpositiven Fläche für sämtliche Inseln bestimmt. Die Ordinate trägt die Skalierung der Insulinpositivität in Prozent. Auf der Abzisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Jeder in der Grafik aufgeführte Einzelwert entspricht dem Mittelwert pro NOD-Maus. Der waagerechte Strich beschreibt den Gruppenmedian. Die Ergebnisse der Gruppe „# 0“ sind im Vergleich zu den jeweiligen Behandlungsgruppen „# 1“ bis „# 4“ signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die unbehandelten NOD-Mäuse lagen in einem Wertebereich zwischen 76 % und 100 %. Der Gruppenmedian betrug 90 % und war der höchste Wert im Vergleich mit den anderen Plasmid- und Cyclophosphamid-behandelten Gruppen.

Die PBS-behandelten Tiere zeigten Werte von 4 % bis 38 %. Der Gruppenmedian betrug 26 %. Bei der Vakzinierung mit  $\beta$ -Aktin-Fc plus Cyclophosphamid zeigten die NOD-Mäuse Werte von 12 % bis 53 % und einen Gruppenmedian von 30 %. Der Wertebereich der Cyclophosphamid-/hICAM-behandelten Tiere unterlag einer starken Streuung. Der niedrigste Wert lag bei 2 % und der höchste Wert bei 54 %. Der Gruppenmedian betrug 34 %. Die mit Cyclophosphamid-/TGF- $\beta$ -behandelten Tiere lagen in einem Bereich von 4 % bis 51 %. Diese NOD-Mäuse zeigten mit 12% den niedrigsten Gruppenmedian von allen Versuchsgruppen.

Zusammenfassend zeigt sich bei den Behandlungsgruppen ein signifikanter Abfall der erhobenen Messdaten ( $p < 0,05$ ). Der Gruppenmedian der Gruppe „# 0“ lag bei 90%. Nach erfolgter Cyclophosphamidbehandlung sanken für alle Behandlungsgruppen die Gruppenmediane auf einen Wert von 34% und tiefer.

Eine weitere Untersuchung zur immunhistochemischen Insulinfärbung für die Vakzinierungsstudie DNAv2 berücksichtigt ausschliesslich die Grad-4-Inseln. Die Grafik (Abb. 24) zeigt die durchschnittliche insulinpositive Inselfläche in Prozent pro NOD-Maus der entsprechenden Versuchsgruppe.

Bei der vergleichenden Betrachtung der einzelnen Versuchsgruppen sind deutliche Schwankungen im Bereich der Einzelwerte festzustellen.

Der niedrigste Wert der unbehandelten Kontrollgruppe lag bei 10 %, der höchste Wert bei 59 % und der Gruppenmedian lag bei 34 %. Für die PBS-behandelten Tiere ergab sich ein Wertebereich von 12 bis 75 % und ein Gruppenmedian von 35 %. Die pcDNA3.1-vakzinieren und Cyclophosphamid-behandelten NOD-Mäuse lagen zwischen 21 % und 53%. Sie zeigten mit 39 % den höchsten Gruppenmedian. Die dreifach TGF- $\beta$ - plus Cyclophosphamid-behandelten Tiere wiesen die grössten Einzelwertschwankungen zwischen 11,25 % und 77 % auf. Die zweifach TGF- $\beta$ /Cyclophosphamid-behandelten Tiere zeigten einen Wertebereich zwischen 5 % und 46,5 %. Der Median beider Gruppen lag fast identisch bei 32 % bzw. 31 %. Den niedrigsten Gruppenmedian bildeten die Cyclophosphamid-/hICAM-behandelten NOD-Mäuse mit 21 %. Der Wertebereich dieser Behandlungsgruppe lag zwischen 9 % und 35 %.

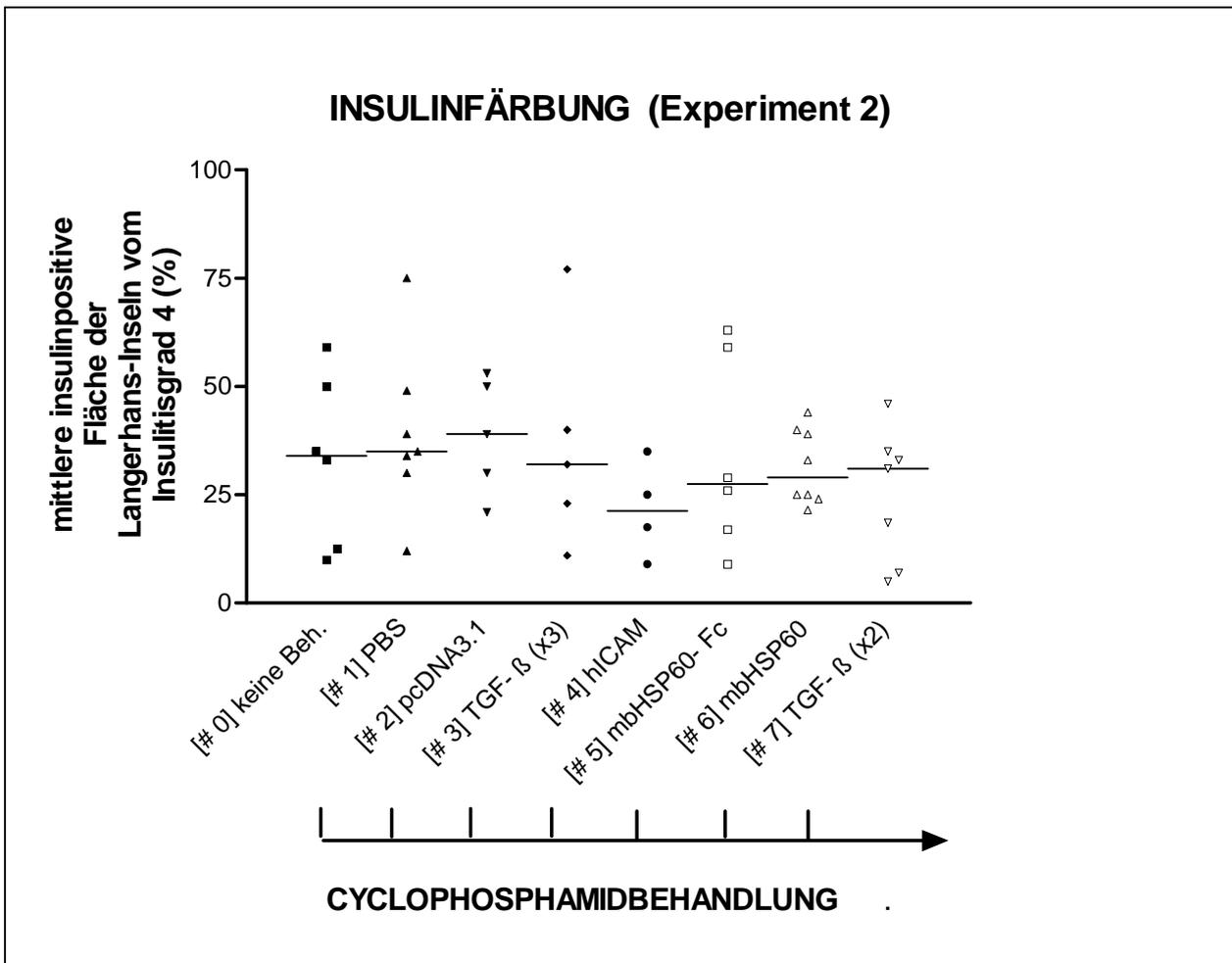


Abb. 24: Analyse der immunhistochemischen Insulinfärbung der Grad-4-Inseln der Vakzinierungsstudie DNAv2 (Experiment 2). Es wurde der prozentuale Anteil der durch eine Farbreaktion dargestellten, insulinpositiven Fläche für sämtliche Grad-4-Inseln bestimmt. Jeder in der Grafik aufgeführte Einzelwert entspricht dem Mittelwert pro NOD-Maus. Die Ordinate trägt die Skalierung der Insulinpositivität in Prozent. Auf der Abzisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Der waagerechte Strich zeigt den Median für jede Versuchsgruppe.

Die NOD-Mäuse, die mit dem „mbHSP60-Fc“-Plasmid vakziniert wurden, hatten einen Median von 27,5 %. Die NOD-Mäuse, denen das „mbHSP60“-Plasmid verabreicht wurde, hatten einen Median von 29 %. Die Einzelwerte der Behandlungsgruppe „# 5“ lagen zwischen 9 % und 63 %. Die Einzelwerte für die Behandlungsgruppe „# 6“ lagen in einem Messbereich zwischen 21,5 % und 44 %.

Die erhobenen Analysen zeigten keinen signifikanten Effekt der oralen Vakzinierung auf die insulinpositive Fläche von stark infiltrierten Inseln.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Der Effekt des Cyclophosphamid**

#### **4.1.1 Einfluß auf das Entzündungsgeschehen**

Beim Cyclophosphamid-induzierten IDDM im Tiermodell der NOD-Maus hat man für das Pankreas ein charakteristisches Th1/Th2-Zytokinmuster in den einzelnen Phasen der Krankheitsentwicklung festgestellt.

Dem Th1-Muster werden die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 als typische Vertreter zugeordnet. Zum Th-2-Muster zählen z.B. IL-4, IL-6, IL-10 und TGF- $\beta$  [20, 25].

Th1-Zytokine werden mit der Manifestation des IDDM in Verbindung gebracht. Sie aktivieren APZ und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, welche beide an der  $\beta$ -Zelldestruktion in den Langerhans-Inseln beteiligt sind. Gleichzeitig wirken die Th1-Zytokine antagonistisch auf die Th2-Zytokine und deren Produktion. Die Zytokine, die dem Th2-Muster zugeordnet werden, wurden bislang als antiinflammatorisch und protektiv im Krankheitsgeschehen des Typ 1 Diabetes besprochen. Forschungsergebnisse neuerer Zeit stellen diese Unterteilung in Frage, da z.B. für IL-10 eine stimulatorische Wirkung auf zytotoxische T-Zellen und APZ festgestellt werden konnte [89].

Es gilt jedoch, dass die Entstehung des IDDM unter der Kontrolle von Th1- und Th2-Zellen und deren Zytokinen liegt. Th1- und Th2-Mechanismen verhalten sich antagonistisch. Unter bestimmten Umständen mögen Th2-Immunantworten destruktive Th-1-Mechanismen unterstützen, aber dennoch korreliert die Th2-Reaktion insgesamt mit einem benignen Insulitisgeschehen, die Th1-Reaktion wird als destruktiv beschrieben [17].

Studien konnten beweisen, dass es beim Cyclophosphamid-beschleunigten Krankheitsverlauf nach 10 Tagen im Pankreas zu einem deutlichen Th1-Shift (IFN- $\gamma$ /IL-10) kommt [10,11,14].

Auch in den beschriebenen Experimenten zeigte sich die Beschleunigung der Progression der Insulitis nach Cyclophosphamidgabe. Eine einzelne Cyclophosphamid-Injektion von 250 mg/kg Körpergewicht bewirkte eine massive Einwanderung von mononukleären Zellen in das Inselgewebe des Pankreas innerhalb von 10 Tagen. Man beobachtete einen signifikanten Anstieg des Insulitisgrades von Grad 1 – 2 am Tag 0 (unbehandelte Tiere) auf Grad 4 am Tag 10 (Cyclophosphamid-behandelte Tiere).

Die unbehandelten Tiere der „# 0“-Gruppen unterlagen in beiden Studien einer gewissen normalen Streuung. Die Schwere der Insulitis verteilte sich zwischen Grad 1 und 2. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme 70 Tage alt und somit in der sogenannten prädiabetischen Phase.

Zu diesem frühen Zeitpunkt fand man eine geringgradige Einwanderung von hauptsächlich APZ. Hierbei handelt es sich um Makrophagen und Dendritische Zellen. Man nimmt an, dass infolge dessen T-Lymphozyten aktiviert werden. Es kommt zu deren Einwanderung in das Inselgewebe [4]. Diese ersten frühen infiltrierenden Immunzellen führen aber zunächst zu keiner Destruktion der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen [12]. Es sind ausschließlich die Randbereiche der Inseln von der Infiltration betroffen. Meist ist eine fokale Form des Infiltrationsgeschehens zu beobachten. Es handelt sich um eine frühe, nicht-destruktive Periinsulitis [17].

10 Tage nach der intraperitonealen Applikation von Cyclophosphamid zeigten die Behandlungsgruppen „# 1“ einen starken Anstieg der Infiltration. Der Infiltrationsgrad manifestierte sich im Bereich von Grad 4. Im Experiment 1 war dies für 100% der Tiere der Fall, im Experiment 2 zeigte sich dieses Phänomen bei 88% der Tiere. Für beide Studien ergab sich ein signifikanter Anstieg des Insulitisgeschehens durch Cyclophosphamid ( $p < 0,0002$  Experiment 1;  $p < 0,002$  Experiment 2).

Das Cyclophosphamid bewirkte eine massive zellige, destruktive Infiltration der Langerhans-Inseln des Pankreas. Die Einwanderung von APZ und T-Lymphozyten schritt fort. Man spricht von einer Intrainsulitis. Diese Intrainsulitis hat die Destruktion der  $\beta$ -Zellen zur Folge. Dieser Krankheitsverlauf führt zu einer allmählichen Stagnation der Insulinsynthese durch die  $\beta$ -Zellen.

#### **4.1.2 Synchronisation des Krankheitsverlaufs**

Auch die Synchronisation des Krankheitsverlaufs lässt sich durch die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren. Während beim spontanen IDDM der NOD-Maus die latente, nicht destruktive Phase mehrere Monate dauert, bis sich eine massive Insulitis vom Grad 4 entwickelt hat, zeigte sich im durchgeführten Experiment 10

Tage nach der einmaligen Gabe des Zytostatikums histologisch ein ausgeprägtes Infiltrationsgeschehen.

Die unbehandelten Tiere unterlagen, wie bereits erwähnt, einer normalen Streuung am Tag 0. Die Tiere befanden sich in einer spontanen, latenten, prädiabetischen Krankheitsphase. Durch die Cyclophosphamidverabreichung kam es zu einem sprunghaften Anstieg auf Insulitisgrad 4 bei allen NOD-Mäusen.

Alle Tiere befanden sich in einem identischen Insulitisstadium. Die Streuung der Werte wurde aufgehoben. Am Tag 10 zeigten alle behandelten Tiere einen Insulitisgrad 4. Das Infiltrationsgeschehen konnte synchronisiert werden.

Die Synchronisation und die Beschleunigung sind für die experimentelle Vakzinierungsbehandlung von besonderer Bedeutung. Um eine Wirkung der Plasmidbehandlung analysieren zu können, braucht man eine Vereinheitlichung der Versuchsbedingungen, die erst durch die Gabe von Cyclophosphamid erreicht wird. Alle NOD-Mäuse befinden sich in einem synchronen Krankheitsstadium und ermöglichen sowohl eine optimale Vergleichbarkeit der Einzeltiere innerhalb der Behandlungsgruppen als auch eine Vergleichbarkeit der Behandlungsgruppen miteinander. Die Schwankungsbreite von Ergebnissen innerhalb eines Experimentes kann durch Cyclophosphamid reduziert werden [4].

Aufgrund der histologischen Befunde konnte auf der Ebene des Th1-/Th2-Geschehens ebenfalls in eine benigne und eine destruktive Phase der Insulitis unterschieden werden. Es konnte ein direkter Zusammenhang einer Th2-Aktivität mit einer benignen Insulitisform festgestellt werden. Für die frühe Periinsulitis zeigt sich eine Th2-Dominanz durch vermehrte IL-4-Ausschüttung von den T-Helferzellen. In der späten destruktiven Phase wurde dagegen eine Th1-Dominanz beobachtet. Die APZ sezernierten die Zytokine IL-12 und IL-18, welche synergistisch auf die IFN- $\gamma$ -Expression wirkten. Es kam zu einem Shift von einem Th2- zu einem Th1-Immungeschehen [2, 4].

#### **4.2. Analyse der Zytokingenexpression im Darmimmunsystem während der cyclophosphamidinduzierten Krankheitsentwicklung**

Es bestehen Zusammenhänge zwischen dem Darm, dem Darmimmunsystem und der Pathogenese des IDDM. Die orale Applikation von Insulin bei NOD-Mäusen konnte die Progression des Diabetes unterdrücken [34]. Die zusätzliche Administration von bakteriellem Adjuvans, einem OM-89-Proteinextrakt aus *Escherichia coli*, unterstützte diesen Effekt signifikant. RT-PCR-Analysen der Darmzytokine, die bei diesen NOD-Mäusen durchgeführt wurden, zeigten eine deutliche Th2-Antwort. Die IL-10- und TGF- $\beta$ -Spiegel wurden hochreguliert, während das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  und das Enzym „Inducible Nitric Oxide Synthase“ (iNOS) runterreguliert wurden [36].

Lebensmittelantigene spielen als exogene Faktoren in der Pathogenese des IDDM eine Rolle. Die Proteinfractionen von Weizen, Soja oder Kuhmilch zeigten diabetogene Wirkung [46, 54, 55]. So konnte die Diabetes-Rate bei NOD-Mäusen durch gezielte diätetische Fütterung beeinflusst werden. Caseinhydrolysate als Proteinquelle konnten eine Diabetesentwicklung bei Jungtieren hemmen [52].

Es wurde untersucht, wie das Darmimmunsystem auf der Ebene der Zytokingenexpression durch die Gabe von Cyclophosphamid beeinflusst wird.

Die vorliegenden Analysen der intestinalen Zytokingenexpression beschäftigen sich mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als Vertreter für das proinflammatorische Th1-Muster. IL-10 und TGF- $\beta$  gelten als zentrale antiinflammatorische Zytokine im Darmimmungeschehen [50].

Die Grundlage für die Auswahl der gemessenen Parameter stellen Forschungsergebnisse aus vorangegangenen Studien zum „natürlichen Diabetesverlauf“ für den Darm und das Pankreas und zum „Cyclophosphamid-beschleunigten Verlauf“ für den Darm dar. RT-PCR-Messungen für den Darm (natürlicher Verlauf) zeigten einen Shift in Richtung Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) nach Diabetesmanifestation. Gleichzeitig nahmen die Zytokinlevel von IL-10 und TGF- $\beta$  ab. Die Ratios sowohl für IFN- $\gamma$ /IL-10, als auch für IFN- $\gamma$ /TGF- $\beta$  zeigten für die nicht-diabetischen Tiere einen Verlauf in Richtung Th2. Bei den diabetischen Tiere kam es nach 14 Wochen zu einem Th1-Shift [96].

Für das Pankreas (natürlicher Verlauf) ergaben die Messungen einen Zytokin-Shift innerhalb von 14 Wochen. Die nicht-diabetischen NOD-Mäuse zeigten steigende TGF- $\beta$ -Level. Bei den diabetischen NOD-Mäusen konnten sinkende TGF- $\beta$ -Level beobachtet werden. Beim Cyclophosphamid-beschleunigten Verlauf konnte nach 10 Tagen im Pankreas ein deutlicher Th1-Shift (IFN- $\gamma$ /IL-10) gemessen werden [10,11,14].

Die Zytokingenexpression im Darm der NOD-Mäuse nach Cyclophosphamidbehandlung zeigte für die mRNA-Messungen von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  keine signifikanten Veränderungen. Drei Tage nach der Injektion von 250 mg/kg Cyclophosphamid zeigte sich für das IL-10 ein signifikanter Shift von einer Th2-Reaktion in Richtung Th1-Reaktion.

Die Abnahme dieses bedeutenden anti-inflammatorischen Mediators im Darm weist auf den entzündungsfördernden Effekt von Cyclophosphamid hin. Das Ergebnis unterstützt die Annahme, dass IL-10 als Marker für den Cyclophosphamid-induzierten Diabetesverlauf im Darmmimmungeschehen in vivo von Relevanz ist.

Ein weiterer interessanter Befund ist die Streuung der Einzelwerte. Für IL-10, INF- $\gamma$  und TGF- $\beta$  zeigten sich bereits die Kontrolltiere am Tag 0 als sehr heterogen. Auch die dargestellten Th1/Th2-Ratios zeigten große Unterschiede.

Die Befunde weisen auf eine hohe Labilität des Zytokingleichgewichts im Darm von NOD-Mäusen hin. Durch die Gabe von Cyclophosphamid konnte die Immunbalance im Darm nicht gleichgeschaltet werden. Es kam zu einem sinkenden IL-10-mRNA-Spiegel. Insgesamt wurde daher der Insulitis-fördernde Effekt von Cyclophosphamid nicht über eine entsprechend starke Auslenkung der Th1-/Th2-Balance des Darmmimmunsystem gestützt. Nach Behandlung mit dem Zytostatikum konnte daher nur für das Pankreas ein deutlicher Shift der untersuchten Marker in Th1-Richtung beobachtet werden. Innerhalb von 10 Tagen war ein deutlicher Th1-Shift für IFN- $\gamma$  zu detektieren.

### **4.3 Modulation der Insulinitis durch orale Vakzinierung mit Plasmid-DNA-Konstrukten**

#### **4.3.1 Applikation und Expression der pDNA-Konstrukte**

In der vorliegenden Studie wurde die lösliche pDNA oral systemisch appliziert. Die Flüssigkeit wurde mittels einer gebogenen Knopfsonde direkt im Oesophagus der NOD-Mäuse abgesetzt. Das Ziel ist zu sichern, dass jedes Tier die exakt gleichen Mengen erhielt. Die Vakzine erhält über die Schleimhäute des Verdauungstraktes Eintritt in den Organismus.

Der Weg der oralen Administration stellt, im Vergleich zu den Injektionstechniken, eine nicht-invasive Methode dar. Ausserdem sind bislang keine unerwarteten schädigenden Nebenwirkungen von oraler pDNA bekannt [59].

Die orale Applikation bietet sich an, um Immunantworten über die intestinalen Schleimhäute zu induzieren [61, 62]. Um zu gewährleisten, dass eine grösstmögliche Dosis DNA-Vakzine die Zellen des Darmes erreicht, wurden pro oraler Applikation 50 µg pDNA gelöst in 200 µl PBS gegeben. Dosen in dieser, aber auch in geringeren Grössenordnungen konnten in diversen Vakzinierungsstudien Effekte erzielen und Immunantworten auslösen.

Es gilt zu berücksichtigen, dass durch intramuskuläre bzw. intradermale Applikation lokal eine höhere Konzentration in einem eng umschriebenen Gewebeabschnitt erzielt wird. Bei der oralen Vakzination dagegen bietet die Oberfläche des Gastrointestinaltraktes eine wesentlich grössere Wirkungsfläche für die Moleküle. Auf der anderen Seite ist es deshalb um so schwieriger, einen direkten Nachweis zu erbringen, ob und welche Mengen der pDNA die Zielzellen erreicht haben.

Enzymatische Verdauungsprozesse und das vorherrschende pH-Milieu haben weiteren Einfluss auf die Stabilität der DNA-Sequenzabschnitte. So weiss man, dass die ringförmige DNA-Struktur eine geringere Angriffsfläche für lytische und enzymatische Prozesse bietet als eine lineare DNA-Struktur [58].

### 4.3.2 Vakzinierung mit pDNA-Konstrukten

Die Verabreichung von proteinkodierender pDNA kann Immunantworten induzieren. Im Mausmodell konnte durch Injektion (intramuskulär und intradermal) von pDNA, welche kodierend für die Insulin-B-Kette war, die Häufigkeit der Krankheitsentstehung des IDDM um 50% gesenkt werden [18].

Plasmid-DNA, welche kodierend für IL-4 bzw. für das Peptidfragment GAD65-IgGFc war, wurde NOD-Mäusen intramuskulär injiziert. Es konnte eine Th2-gerichtete Immunantwort und eine Minderung der Insulinitisentwicklung beobachtet werden [85].

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die wiederholte orale Administration der pDNA-Vakzine ein möglicher inhibierender Effekt auf das cyclophosphamidbeschleunigte und –synchronisierte Infiltrationsgeschehen und die damit einhergehende  $\beta$ -Zelldestruktion untersucht werden. Zum möglichen Mechanismus sollte geprüft werden, ob die oral verabreichten pDNA-Vakzine das Darmimmunsystem modulieren.

Die Vakzinierung mit den TGF- $\beta$ - und ICAM-1-kodierenden pDNA-Konstrukten stellen die eigentlichen Behandlungsgruppen dar. Als Kontrollen fungierten die Gruppen, die mit dem reinen pcDNA3.1-Vektor bzw. mit dem  $\beta$ -Aktin-Konstrukt behandelt worden sind.

Die Ergebnisse zeigten signifikant den induzierenden und beschleunigenden Effekt des Cyclophosphamids auf die Entstehung einer massiven Insulinitis vom Grad 4. Die Injektion von Cyclophosphamid induzierte auf Zytokinebene steigende Mengen von IFN- $\gamma$ - und IL-12p40-mRNA [4,84]. Demnach kam es zur Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort. Diese Befunde belegen, dass das Cyclophosphamid sowohl auf histologischer als auch auf Zytokinebene einen signifikanten Th1-gerichteten Effekt auf die infiltrierenden Zellen des Pankreas von NOD-Mäusen bewirkt.

In einer früheren Publikation konnte gezeigt werden, dass die orale Vakzinierung von NOD-Mäusen mit für ICAM-1- oder TGF- $\beta$ -codierende DNA die pankreatische Th1-/Th2-Balance nach Cyclophosphamidgabe beeinflusst. Es kam zu einer deutlichen

Verringerung des Th1-/Th2-Verhältnisses mit einem Abfall der IFN- $\gamma$  und einem Anstieg der IL-10 mRNA-Menge im Pankreas [4, 84].

IL-10, als Th-2-assoziiertes Zytokin, ist demnach ein Indikator für einen anti-inflammatorische, regulative Immunantwort auf die verabreichte Vakzine. Die sinkende IFN- $\gamma$ /IL-10-Ratio zeigt die Suppression einer destruktiven Insulitis [14, 17, 99]. An dieser Stelle sollte dennoch erwähnt werden, dass gegenteilige Publikationen auch einen beschleunigenden Effekt auf das diabetische Krankheitsgeschehen im Pankreas für IL-10 berichten [100, 101]. Diese Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit durch die immunhistochemischen Untersuchungen, die im Kapitel 4.4 ausführlich diskutiert werden, nicht bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte der immunmodulatorische Effekt der pDNA-Konstrukte histologisch nicht gezeigt werden. Die Vakzinierungsbehandlungen konnten im mikroskopischen Bild einer Progression der Inselinfiltration nicht deutlich entgegenwirken. Der Vergleich der unbehandelten Kontrolltiere mit den vakzinieren und Cyclophosphamid-behandelten Tieren zeigte eine signifikante Progression der zelligen Infiltration in den Langerhans-Inseln. Dieser durch Cyclophosphamid beschleunigte Krankheitsverlauf bis hin zum Insulitisgrad 4 konnte durch die unterschiedlichen Plasmid-Vakzinen histologisch erkennbar nicht beeinflusst werden. Dies zeigt der Vergleich zwischen den Cyclophosphamid-behandelten Kontrolltieren, denen lediglich PBS-Lösung oral verabreicht wurde, mit den Cyclophosphamid-behandelten Versuchgruppen, bei denen die Vakzinierung mit pDNA-Konstrukten erfolgte.

Insgesamt ergab sich, dass die orale Vakzinierung mit für ICAM-1- oder TGF- $\beta$ -Kodierenden pDNA-Konstrukten zwar die immunregulatorische Balance des Inselinfiltrats verändern kann [4, 84], aber unter den hier gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf das quantitative Ausmaß der Inselinfiltration oder die räumliche Verteilung des Infiltrats hatte.

### **4.3.3 Immunhistochemische Analyse der Insulinproduktivität in den Langerhans-Inseln von NOD-Mäusen**

Die immunhistochemischen Insulinfärbungen der Langerhans-Inseln der NOD-Mäuse sollten Aufschluss über die Insulinproduktivität der  $\beta$ -Zellen des Pankreas geben. Die Darstellung der insulinpositiven Inselfläche mittels der Immunperoxidase-Färbetechnik erlaubt Rückschlüsse auf das Ausmass der  $\beta$ -Zelldestruktion. Durch die Farbreaktion kann gezeigt werden, wie gross die produktive Fläche einer Insel ist. Die Fläche, die nicht von einer massiven  $\beta$ -Zellzerstörung betroffen ist, kann optisch dargestellt werden.

In den Experimenten 1 wurden sämtliche Langerhans-Inseln, unabhängig von ihrem Insulitisgrad, ausgewertet. Die unbehandelten NOD-Mäuse zeigten eine hohe Insulinpositivität zwischen 76 % und 100 % (vgl. Abb. 13 und Abb. 23). Die hohe Insulinpositivität ist Indikator für die vorliegende Insulinsynthese und somit für funktionstüchtige Inselzellen. Für die nichtbehandelten Kontrolltiere zeigt dieses Ergebnis eine Korrelation einer hohen Insulinpositivität (76 % bis 100 %) der Langerhans-Inseln mit einem geringen Infiltrationsgeschehen bzw. mit niedrigen Insulitisgraden zwischen Grad 0 und Grad 2,8. Dies erlaubt einen Vergleich der Insulitisgraduierung mit der Insulinsynthese (vgl. Abb. 25).

Die Cyclophosphamid-PBS-Gruppe, die als Kontrollgruppe fungierte, und die Cyclophosphamid-pDNA-behandelten Gruppen zeigten eine verminderte Insulinpositivität. Die sinkende Insulinpositivität aufgrund einer verminderten Insulinsynthese in den Inselzellen korrelierte wiederum mit den Ergebnissen der Graduierungsanalyse. Für die Graduierungsanalyse lagen die Medianwerte der Versuchsgruppen bei 26% mittlerer insulinpositiver Inselfläche für die Cyclophosphamid-PBS behandelten NOD-Mäuse, bei 30% für die Cyclophosphamid- $\beta$ -Aktin-Fc-Versuchsgruppe, bei 34% für die Cyclophosphamid-hICAM-Gruppe und bei 12% für die Cyclophosphamid-TGF- $\beta$ -behandelten Tiere. Mit der zunehmenden Einwanderung mononukleärer Zellen, induziert durch die Injektion von Cyclophosphamid, kam es zu signifikant steigenden Insulitisgraden zwischen Werten von 3,8 und 4 (vgl. Abb. 20 ). Dies bestätigt, dass die Einwanderung von mononukleären Zellen mit einer Destruktion der Inselzellen verbunden ist.

Diese Destruktion bewirkt ein Fortschreiten des Entzündungsgeschehens, der Insulitis und damit einhergehend eine sinkende Insulinproduktivität der  $\beta$ -Zellen.

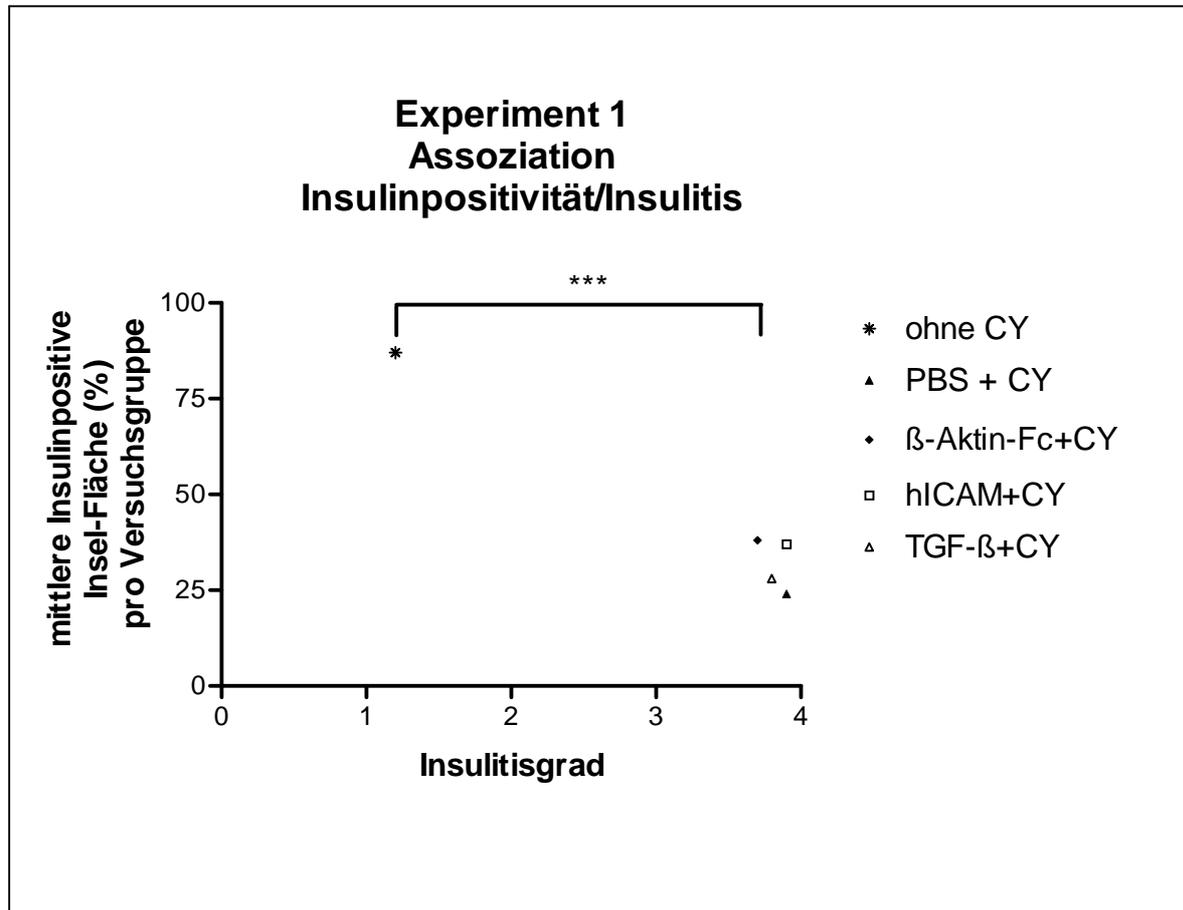


Abb. 25: Assoziation der mittleren insulinpositiven Fläche mit dem mittleren Insulitisgrad. Von jeder Versuchsgruppe wurden der Gruppenmedian der insulinpositiven Fläche in % und der mittlere Insulitisgrad bestimmt. Die Prozentwerte der insulinpositiven Fläche sind auf der Ordinate skaliert, die Abzisse gibt die Insulitisgrade zwischen Insulitisgrad 1 und Insulitisgrad 4 wieder. Jeder aufgetragene Punkt stellt den ermittelten Wert für eine Versuchsgruppe dar, die den Vakzinierungsbehandlungen entsprechend der Legende unterzogen worden sind. Die Ergebnisse der unbehandelten NOD-Mäuse unterscheiden sich signifikant von denen der Cyclophosphamid-behandelten und vakzinierten Tiere ( $p < 0,001$ ). Es besteht eine Assoziation zwischen steigendem Insulitisgrad und sinkender Insulinproduktivität.

Für die Analysen von Experiment 2 wurden ausschliesslich die Inseln vom Insulitisgrad 4 berücksichtigt. Es sollten nur die Inseln auf ihre Insulinpositivität hin untersucht werden, bei denen eine massive destruktive Intrainsulitis vorausgesetzt werden konnte. Der ausschliessliche Vergleich der Grad-4-Inseln sollte eventuelle Effekte bzw. Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bezüglich der Aktivität der  $\beta$ -Zellen zu einem Zeitpunkt darstellen, an dem man bereits von einer massiven Insulitis ausgehen kann.

Der Vergleich der Gruppenmediane sowohl der unbehandelten NOD-Mäuse, als auch der behandelten NOD-Mäuse zeigte keine signifikanten Unterschiede. Der Gruppenmedian der unbehandelten Kontrolltiere lag bei 34 %. Dieser Median-Wert der unbehandelten Kontrolltiere war in einem ähnlichen Wertebereich wie die Gruppenmediane der behandelten Tiere. Sie lagen für die PBS-Gruppe bei 35 %, für die pcDNA3.1-Gruppe bei 39 %, für die dreifach TGF- $\beta$ -Gruppe bei 32 % und für die zweifach TGF- $\beta$ -Gruppe fast identisch bei 31 %. Der Median der hICAM-Gruppe lag bei 21 %, für die mbHSP60-Fc-Gruppe bei 27,5 % und für die mbHSP60-Gruppe bei 29 % (vgl. Abb. 21). Innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen zeigten die Ergebnisse eine Streuung in beide Richtungen.

Inseln, die eine geringere Insulitis und mit hoher Wahrscheinlichkeit eine höhere Insulinpositivität aufgewiesen hätten, wurden nicht, wie bei den Analysen für das Experiment 1, in die Bewertung einbezogen. Sie hätten speziell für die prädiabetischen unbehandelten Tiere das Ergebnis in Richtung einer größeren Insulin-positiven Inselfläche verschoben, wie die Auswertungen für das Experiment 1 belegen.

Beide Experimente zeigen deutlich, dass mit fortschreitender Inselentzündung die Insulinpositivität in den Langerhans-Inseln sank. Das erlaubt den Schluss, dass sich die Destruktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen während des inflammatorischen Infiltrationsgeschehens sowohl bei der spontanen (vgl. unbehandelte NOD-Mäuse) als auch bei der Cyclophosphamid-beschleunigten Krankheitsentstehung ähnlich auf die Insulinsynthese auswirkt. Im Fall der unbehandelten Gruppe lag der Median bei einer Insulinproduktivität von 34 %. Die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen ließ sich durch pDNA-Vakzinierung nicht signifikant beeinflussen.

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Der insulinabhängige Diabetes Mellitus (IDDM) oder Typ 1 Diabetes resultiert aus einer immun-medierten Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas. Die Th1-/Th2-Immunbalance spielt dabei eine wichtige Rolle. T-Helferzellen vom Th1-Typ und deren Zytokinprodukte (z.B. INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) werden als pathogene Immunmechanismen bei der Krankheitsentstehung beschrieben, wohingegen Th-2-assoziierte Immunzellen und deren Zytokinprodukte (z.B. IL-10, TGF- $\beta$ ) als kaum destruktiv oder sogar als protektiv gelten [2, 3, 25].

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem pathoimmunologischen Krankheitsgeschehen des Cyclophosphamid-induzierten Typ 1 Diabetes im Tiermodell der non obese diabetic (NOD) Maus.

Bei der NOD-Maus kommt es durch Infiltration mit mononukleären Zellen zu einer autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen im Pankreas. Zu den infiltrierenden Zellen zählen u.a. Lymphocyten, die in Darm-assoziierten Immungeweben vorkommen [86, 87]. So konnte gezeigt werden, dass der Verlauf des IDDM über das Darmimmunsystem zu beeinflussen ist. Sowohl Nahrungsmittelantigene, diätetische Fütterung, als auch die orale Verabreichung von spezifischen Wirkstoffen auf das Darmimmunsystem konnten den Krankheitsprozess des Typ 1 Diabetes hemmen [51, 53, 56, 57].

Das Alkylanz Cyclophosphamid beschleunigt und synchronisiert im NOD-Modell schon nach einmaliger Injektion das Krankheitsgeschehen. Es kommt zu einem Übergang von einer Th2- zu einer Th-1-Immunantwort [11]. Das Ausmaß der Infiltration in den Langerhans-Inseln des Pankreas bestimmt den Grad der Inselentzündung. Die vorliegenden histologischen Untersuchungen erlaubten eine Unterteilung der Insulitis in vier Grade. Im Mausversuch kam es 10 Tage nach intraperitonealer Injektion von 250 mg/kg Cyclophosphamid bei weiblichen NOD-Mäusen zu einer massiven Infiltration der Inseln und zu einem signifikanten Anstieg der Insulitis auf durchschnittlich Grad 4 ( $p < 0,0002$  Experiment 1;  $p < 0,002$  Experiment 2). Cyclophosphamid induzierte innerhalb von 10 Tagen die Entwicklung einer „destruktiven“ Intransulitis. Diese Ergebnisse stützen vorherige Versuche, bei denen die Progression des Infiltrationsgeschehens durch die Gabe von Cyclophosphamid gezeigt werden konnte [10, 11, 14].

Ein nächster Forschungsansatz waren Zytokinmessungen von Dünndarm mRNA von NOD-Mäusen. Es wurde der Effekt des Cyclophosphamids auf die intestinale Zytokinexpression 3 bzw. 7 Tage nach Injektion gemessen. 6 bis 7 Wochen alte, weibliche NOD-Mäuse wurden mit 250 mg/kg Cyclophosphamid intraperitoneal behandelt. Der Gehalt an mRNA von TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 und TNF- $\alpha$  wurde mittels quantitativer RT-PCR aus Dünndarm isolierter RNA bestimmt. Innerhalb von 3 Tagen zeigte sich eine sinkende Expressionsrate von IL-10, welches mit einer Th2-Immunantwort assoziiert wird.

Das Ziel der Vakzinierungsstudie war eine Modulation des Immungeschehens über die Darmmukosa. In der Vergangenheit konnten durch DNA-Vakzinierung protektive Immunantworten bei infektiösen und autoimmunen Krankheitsbildern ausgelöst werden [60, 63]. Diese Induktion einer schützenden Th2-Antwort durch eine Immunisierung mit DNA könnte den Verlauf des Typ 1 Diabetes günstig beeinflussen. 70 Tage alte, weibliche NOD-Mäuse wurden mit Plasmid-DNA-Konstrukten, welche kodierend für TGF- $\beta$ , hsp60 oder lösliches ICAM-1 waren, oral behandelt. Um den Krankheitsverlauf zu synchronisieren, erhielten die Tiere 250 mg/kg Cyclophosphamid via intraperitonealer Injektion. Ein Teil der Tiere wurde ausschließlich mit Cyclophosphamid behandelt und fungierte als Kontrollgruppen.

Semiquantitative histologische Untersuchungen und immunhistologische Insulinfärbungen zeigten, dass die orale Vakzinierung mit pDNA-Konstrukten das Ausmaß der Inselinfiltration, induziert durch Cyclophosphamid, nicht nachhaltig beeinflussen konnte. Quantitative RT-PCR Analysen von RNA aus dem korrespondierenden Pankreasgewebe zeigten jedoch für die Administration mit ICAM-1-Vakzine und TGF- $\beta$ -Vakzine steigende mRNA-Spiegel für IL-10. Dies spricht für eine entzündungshemmende regulatorische Immunantwort [4, 84].

## **6. SUMMARY**

The insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) results from an immune-mediated destruction of the insulin-producing  $\beta$ -cells in the pancreatic islets of Langerhans.

The Th1-/Th2-immune balance is an important immunological regulator for the progression of the disease. A current hypothesis is that the pathogenic immune response is mediated by a Th1 subset of T-cells and their cytokine products (e.g. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), whereas the protective immune response is mediated by a Th2 subset of T-cells and their cytokine products (e.g. IL-10, TGF- $\beta$ ) [2, 3, 25].

The present studies are about the patho-immunological process of type 1 diabetes in non obese diabetic (NOD) mice, induced by cyclophosphamide.

The NOD-mouse model is an animal model of IDDM that shows autoimmune destruction of the pancreatic  $\beta$ -cells by infiltration with mononuclear cells. Mucosa-derived lymphocytes are described to be among the early infiltrating cells [86, 87]. Attempts to modulate disease progression by targeting the gut immune system seem to be an option to interfere with the disease process. Both food antigens, diet type and oral administration of specific agents were found to exhibit inhibitory effects on the disease progression [51, 53, 56, 57].

The alkylating drug cyclophosphamide has been used to accelerate and synchronise the disease process by inducing a shift from Th2-type to Th1-type immune reactivity [10, 11, 14]. The mononuclear infiltration of pancreatic islets is an inflammatory process named insulinitis. Histological examinations allowed to score the insulinitis by 4 degrees. The present results showed that a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide (250 mg/kg) in female NOD mice resulted in a rapid increase intra-islet infiltration and insulinitis of degree 4 ( $p < 0.0002$  experiment 1;  $p < 0.002$  experiment 2). Cyclophosphamide induced a “destructive” intra-insulinitis within 10 days.

We analysed the effect of cyclophosphamide treatment on the intestinal cytokine pattern of 6 to 7 weeks old female NOD mice. Therefore, the animals were treated with a single injection of 250 mg/kg cyclophosphamide. Control mice remained untreated. The RNA was isolated on day 3 or day 10 from small intestinal tissue and the levels of TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  mRNA were detected by quantitative

RT-PCR analysis. We found decreased IL-10 mRNA expression within 3 days after cyclophosphamide injection. IL-10 is a key cytokine of the Th2-immune response.

Our aim was to modulate the immune response via the enteral mucosal immune cells by oral vaccination with plasmid DNA encoding for TGF- $\beta$ , hsp60 or soluble ICAM-1, i.e., by targeting the mucosal immune system. DNA vaccination can generate protective immunity against infectious and autoimmune diseases [60, 63]. The induction of protective Th2 responses by DNA immunisation might therefore be expected to have an effect on the course of type 1 diabetes.

70 days old female NOD mice were fed with plasmid DNA and received a single injection of 250 mg/kg cyclophosphamide. One group of mice was treated with cyclophosphamide only and served as controls.

Histologic sections and immunohistochemical analysis of pancreas sections showed that oral vaccination with DNA encoding immunomodulatory molecules had no inhibitory effect on the destructive islet infiltration process. Quantitative RT-PCR analysis of corresponding pancreas mRNA showed an increase of IL-10 cytokine levels for ICAM-1 and TGF- $\beta$  treated groups. This suggests the induction of an anti-inflammatory regulatory immune response [4, 84].

## **7. Literaturverzeichnis**

1. EISENBARTH GS (1986): Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease.  
N Engl J Med 314:1360-1368
2. MARTIN S, KOLB H (1998): Pathogenese und Immuntherapie des Diabetes mellitus Typ 1.  
Diab Stoffw 7:17-24
3. KOLB H (1996): Diabetes Typ I: Immunologische Aspekte.  
DAZ 136:17-20
4. VAN DEN ENGEL NK, AN HAACK M, MARTIN S, KOLB H (2002): Oral DNA vaccination with plasmid encoding soluble ICAM-1 modulates cytokine expression profiles in nonobese diabetic mice.  
J Mol Med 80:301-308
5. ATKINSON MA, LEITER EH (1999): The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?.  
Nat Med 5:601-604
6. 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
7. BERGER M, MÜHLHAUSER J (1995): Diabetes mellitus  
M. Berger (Hrsg.), 1995, Urban&Schwarzenberger-Verlag
8. ZIPRIS D, MORDES JP, GREIBER DL, ROSSINI AA (2000): Animal Models of Type 1 Diabetes.  
John Wiley & Sons, Ltd. (2000) Diabetes in the New Millenium:1-16
9. FOX CJ, DANSKA JS. (1997): IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts non-destructive insulinitis in nonobese diabetic mice.  
J Immunol 158:2414-2424
10. ROTHE H, BURKART V, FAUST A, KOLB H (1996): IL-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non obese diabetic mice.  
Diabetologia 39:119-122
11. ROTHE H, FAUST A, SCHADE U, KLEEMANN R, BOSSE G, HIBINO T, MARTIN S, KOLB H (1994): Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon-gamma, but not of interleukin-4.  
Diabetologia 37:1154-1158

12. FAUST A, BURKART V, ULRICH H, WEISCHER CH, KOLB H (1994): Effect of lipoic acid on cyclophosphamid-induced diabetes and insulinitis in non-obese diabetic mice.  
Int J Immunopharmac 16:61-66
13. ABLAMUNITS V, QUINTANA F, RESHEF T, ELIAS D, COHEN IR (1999): Acceleration of autoimmune diabetes by cyclophosphamide is associated with an enhanced IFN-gamma secretion pathway.  
J Autoimmun 13:383-392
14. ROTHE H, O'HARA Jr. RM, MARTIN S, KOLB H (1997): Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)<sub>2</sub>.  
Diabetologia 40:641-646
15. HARADA M, MAKINO S (1984): Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide.  
Diabetologia 27:604-606
16. SHIMADA A, CHARLTON B, TAYLOR-EDWARDS C, FATHMAN CG (1996):  $\beta$ -Cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in nonobese diabetic mice.  
Diabetes 45:1063-1067
17. KOLB H (1997): Benign versus destructive insulinitis.  
Diabetes/ Metab Rev 13:139-146
18. KOLB H, KOLB-BACHOFEN V (2000): The Natural History of Insulinitis in Autoimmune Diabetes.  
John Wiley & Sons, Ltd. (2000) Diabetes in the New Millennium :17-25
19. RABINOVITCH A (1994): Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM, therapeutic intervention by immunostimulation?  
Diabetes 43:613-621
20. RABINOVITCH A, SUAREZ-PINZON WL (1998): Cytokines and their roles in pancreatic islet  $\beta$ -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus.  
Biochem Pharmacol 55:1139-1149
21. KELLER R: "Immunologie und Immunpathologie; Eine Einführung"  
R. Keller (Hrsg.), 4. Auflage, 1994, Thieme-Verlag
22. SENFTINGER K (1997): Produktion und funktionelle Charakterisierung von rekombinanten Immunmediatoren.  
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
23. GEMSA D, KALDEN JR, RESCH K: „Immunologie“  
D. Gemsa (Hrsg.), 3. Auflage, 1991, Thieme-Verlag

24. KIRCHNER H: „Cytokine und Interferone“  
H. Kirchner (Hrsg.), 1993, Spektrum, Akademischer Verlag
25. LAFAILLE JJ (1998): The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases.  
Cytok/Growth Fac Rev 9:139-151
26. ROGLER G, ANDUS T (1998): Cytokines in inflammatory bowel disease.  
World J Surg 22:382-389
27. FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMANN TR (1989): Two types of mouse T helper cell. IV. – Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.  
J Exp Med 170:2081-2095
28. PARRY SL, SEBBAG M, FELDMANN M, BRENNEN FM (1997):  
Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production. Role of T Cell membrane TNF- $\alpha$ .  
J.Immunol 158: 3673-3681
29. FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD M, O’GARRA A (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.  
J Immunol 147:33815
30. ROTHE H (1997): Makrophagen-Kontrollmechanismen beim Typ I Diabetes.  
Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
31. MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL (1986): Two types of murine helper t cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.  
J Immunol 136:2348-2357
32. LIBLAU R, SINGER S, McDEVITT HO (1995): Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune disease.  
Immunol Today 16:34
33. CALCINARO F, GAMBELUNGHE G, LAFFERTY KJ (1997): Protection from autoimmune diabetes by adjuvant therapy in the non-obese diabetic mouse: the role of interleukin-4 and interleukin-10.  
Immunol Cell Biol 75:467-471
34. HANCOCK WW, POLANSKI M, ZHANG J, BLOGG N, WEINER HL (1995):  
Suppression of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and -10, transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin-E.  
Am J Pathol 147:1193-1199
35. KOLB H, WÖRZ-PAGENSTERT U, KLEEMANN R, ROTHE H, ROWSELL P, SCOTT FW (1996): Cytokine gene expression in the BB rat pancreas: natural course and impact of bacterial vaccines.  
Diabetologia 39:1448-1454

36. HARTMANN B, BELLMANN K, GHIEA I, KLEEMANN R, KOLB H (1997): Oral insulin for diabetes prevention in NOD mice: potentiation by enhancing Th2 cytokine expression in the gut through bacterial adjuvant.  
*Diabetologia* 40:902-909
37. PENNLINE KJ, ROQUE-GAFFNEY E, MONAHAN M (1994): Recombinant human IL-10 (rHU- IL-10) prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse.  
*Clin Immunol Immunopathol* 71:169-175
38. POWRIE F, COFFMAN RL (1993): Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention.  
*Immunol Today* 14:270-274
39. KOLB-BACHOFEN V, KOLB H (1989): A role for macrophages in the pathogenesis of Type I diabetes.  
*Autoimmunity* 3:145-155
40. AUGSTEIN P, ELEFANTY AG, ALLISON J, HARRISON LC (1998): Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes.  
*Diabetologia* 41:1381-1388
41. RABINOVITCH A (1998): An update on cytokine in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.  
*Diabetes Metab Rev* 14:129-151
42. FAULKNER-JONES BE.; DEMPSEY-COLLIER.; MANDEL TE.; HARRISON LC. (1996): Both TH1 and TH2 cytokine mRNAs are expressed in the NOD mouse pancreas in vivo.  
*Autoimmunity* 23:99-110
43. PILSTROM B, BJORK L, BOHME J (1995): Demonstration of a TH1 cytokine profile in the late phase of NOD insulinitis.  
*Cytokine* 7:806-814
44. MARTIN S, HIBINO T, FAUST A, KLEEMANN R, KOLB H (1996): Differential Expression of ICAM-1 and LFA-1 versus L-selectin and VCAM-1 in Autoimmune Insulinitis of NOD Mice and Association with both Th1- and Th2-type Infiltrates.  
*J Autoimmun* 9:637-643
45. WEINER HL (1997): Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases.  
*Immunol Today* 18:335-341
46. SCOTT F, CUI J, ROWSELL P (1994): Food and the development of autoimmune disease.  
*Trends Food Sci Technol* 5:111-116

47. SIMECKA JW (1998): Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance.  
Adv Drug Delivery Rev 34:235-259
48. VAARALA O (1999): Gut and the induction of immune tolerance in type I diabetes.  
Diabetes Metab Res Rev 15:353-361
49. GARSIDE P, MCL MOWA A (1997): Mechanisms of oral tolerance.  
Critical Rev Immunol 17:119-137
50. STROBER W, KELSALL B, FUSS I, MARTH T, LUDVIKSSON B, EHRHARDT R, NEURATH M (1997): Reciprocal IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  responses regulate the occurrence of mucosal inflammation.  
Immunol Today 18:61-64
51. SCOTT FW, ELLIOTT RB, KOLB H (1989): Diet and autoimmunity: prospects of prevention of type I diabetes.  
Diabetes Nutr Metab 2:61-73
52. ELLIOTT RB, REDDY SN, BIBBY NJ, KIDA K (1988): Dietary prevention of diabetes in the nonobese diabetic mouse.  
Diabetologia 31:62-64
53. REDDY S, BIBBY NJ, D. WU, SWINNEY C, BARROW G, ELLIOTT RB (1995): A combined casein-free-nicotinamide diet prevents diabetes in the NOD mouse with minimum insulinitis.  
Diab Res Clin Practice 29:83-92
54. HARRISON LC, HONEYMAN MC (1999): Cow's milk and type I diabetes: the real debate is about mucosal immune function.  
Diabetes 48:1501-1507
55. KOLB H, POZZILLI P (1998): Cow's milk and type I diabetes: the gut immune system deserves attention.  
Immunol Today 20:108-110
56. BELLMANN K, KOLB H, HARTMANN B, ROTHE H, ROWSELL P, RASTEGAR S, BURGHARDT K, SCOTT FW (1997): Intervention in autoimmune diabetes by targeting the gut immune system.  
Int J Immunopharmac 19:573-577
57. ZHANG ZJ, DAVIDSON L, EISENBARTH G, WEINER HL (1991): Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin.  
Proc Natl Acad Sci USA 88:10252-10256
58. LOWRIE DB (1998): DNA vaccination exploits normal biology.  
Nat Med 4:147-148

59. RAMSAY AJ, RAMSHAW IA, ADA GL (1997): DNA immunization.  
Immunol Cell Biol 75:360-363
60. RAMSHAW IA, FORDHAM SA, BERNARD CC, MAGUIRE, COWDEN WB, WILLENBORG DO (1997): DNA vaccines for the treatment of autoimmune disease.  
Immunol Cell Biol 75:409-413
61. CHEN SC, JONES DH, FYNAN EF, FARRAR GH, CLEGG JCS, GREENBERG HB, HERRMANN JE (1997): Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles.  
J Virol 72:5757-5761
62. CHUN S, DAHESIA M, LEE S, EO SK, ROUSE BT (1999): Distribution fate and mechanism of immune modulation following mucosal delivery of plasmid DNA encoding IL-10.  
J Immunol 163:2392-2402
63. LOBELL A, WEISSERT R, STORCH MK, SVANHOLM C, DE GRAAF K, LASSMANN H, ANDERSSON R, OLSSON T, WIGZELL H (1998): Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis.  
J Exp Med 187:1543-1548
64. FILIPPOVA M, LIU J, ESCHER A (2001): Effects of plasmid DNA injection on cyclophosphamide-accelerated diabetes in NOD mice.  
DNA Cell Biol 20:175-181
65. JÄÄTTELÄ M, WISSING D (1992): Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine.  
Ann Med 24:249-258
66. WELCH WJ, GARRELS JI, THOMAS GP, LIN JJ.-C, FERAMISCO JR (1983): Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and Ca<sup>2+</sup>-ionophore-regulated proteins.  
J Biol Chem 258:7102-7111
67. LINDQUIST S, CRAIG EA (1988): The heat shock proteins.  
Annu Rev Genet 22:631-677
68. SYLDATH U (2000): Aktivierung und Desensibilisierung humaner Monozyten durch humanes Hitzeschockprotein 60.  
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf

69. ELIAS D, COHEN IR (1995): Treatment of autoimmune diabetes and insulinitis in NOD mice with heat shock protein 60 peptide p 277.  
Diabetes 44:1132-1138
70. ELIAS D, RESHEF T, BIRK OS, VAN DER ZEE R, WALKER MD, COHEN IR (1991): Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein.  
Proc Natl Acad Sci USA 88:3088-3091
71. ELIAS D, AVIRAM M, ABLAMUNITS V, BIRK OS, CARMİ P, KÖNEN-WAISMANN S, COHEN IR (1997): Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various  $\beta$ -cell-antigens.  
Diabetes 46:758-764
72. BIRK OS, DOUEK DC, ELIAS C, TAKACS K, DEWCHAND H, GUR SL, WALKER MD, VAN DER ZEE R, COHEN IR, ALTMANN DM (1996): A role of Hsp60 in autoimmune diabetes: analysis in a transgenic model.  
Proc Natl Acad Sci USA 93:1032-1037
73. QUINTANA FJ, ROTEM A, CARMİ P, COHEN IR (2000): Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity.  
J Immunol 165:6148-6155
74. SPRINGER TA (1990): Adhesion receptors of the immune system.  
Nature 346:425-434
75. EDELMANN GM (1983): Cell adhesion molecule.  
Science 219:450-457
76. CARLOS M, HARLAN JM (1994): Leucocyte-endothelial adhesion molecules.  
Blood 84:2068-2101
77. ADAMS DC, SHAW S (1994): Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration.  
Lancet. 343:831-836
78. ROITT IM, BROSTOFF J, MALE DK: "Kurzes Lehrbuch der Immunologie"  
I. M. Roitt (Hrsg.), 3. Auflage, 1995, Thieme-Verlag
79. ROTHLEIN R, MAINOLFI EA, CZAIJKOWSKI M, MARLIN SD (1991): A form of circulating ICAM-1 in human serum.  
J Immunol 147:3788-3793
80. ROTHLEIN R, MARLIN SD, SPRINGER TA (1986): A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1.  
J Immunol 137:1270-1274

81. YAGI N, YOKONO K, AMANO K, NAGATA M, TSUKAMOTO K, HASEGAWA Y, YONEDA R, OKAMOTO N, MORIYAMA H, MIKI M (1995): Expression of intercellular adhesion molecule 1 on pancreatic beta-cells accelerates beta-cell destruction by cytotoxic T-cells in murine autoimmune diabetes.  
Diabetes 44:744-752
82. MARTIN S, HEIDENTHAL E, SCHULTE B, KOLB H ( 1998): Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 inhibit insulinitis and onset of autoimmune diabetes.  
Diabetologia 41:1298-1303
83. VAN DEN ENGEL NK, HEIDENTHAL E, VINKE A, KOLB H, MARTIN S (2000): Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1.  
Blood 95:1350-1355
84. VAN DEN ENGEL NK (2001): The Role of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in experimental diabetes.  
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Veterinärmedizinischen Fakultät Utrecht, Niederlanden
85. TISCH R, WANG B, WEAVER DJ, LIU B, BUI T, ARTHOS J, SERREZE DV (2001): Antigen-specific mediated suppression of  $\beta$ -cell-autoimmunity by plasmid DNA vaccination.  
J Immunol 166:2122-2132
86. HÄNNINEN A, SALMI M, SIMELL O, JALKANEN S (1996): Mucosa-associated (beta 7-integrin(high)) lymphocytes accumulate early in the pancreas of NOD mice and show aberrant recirculation behavior.  
Diabetes 45:1173-1180
87. HÄNNINEN A, JAAKKOLA I, JALKANEN S (1998): Mucosal addressin is required for the development of diabetes in nonobese diabetic mice.  
J Immunol 160:6018-6025
88. SCOTT FW, CLOUTIER HE, KLEEMANN R, WÖERZ-PAGENSTERT U, ROWSELL P, MODLER HW, KOLB H (1997): Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats: dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from Th1 to Th2 cells.  
Diabetes 46:589-598
89. WASSIM Y, ALMAWI WY, TAMIN H, AZAR ST (1999): T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type 1 (insulin-dependent) diabetes.  
J Clin Endocrinol Metab 84:1497-1502

90. O'BRIEN BA, HARMON BV, CAMERON DP, ALLAN DJ (1997): Apoptosis is the mode of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse.  
Diabetes 46:750-757
91. REDDY S, YIP S, KARANAM M, POOLE CA, ROSS JM (1999): An immunohistochemical study of macrophage influx and the co-localization of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of non-obese diabetic (NOD) mice during disease acceleration with cyclophosphamide.  
Histochem J 31:303-314
92. COON B, AN LL, WHITTON L, VON HERRATH MG (1999): DNA immunization to prevent autoimmune diabetes.  
J Clin Invest 104:189-194
93. MOSMANN TR (1991): Cytokine secretion phenotypes of TH cells: how many subsets, how much regulation?.  
Res Immunol 142: 9-13
94. FALCONE M, YEUNG B, TUCKER L, RODRIGUEZ E, SARVETNICK N (1999): A defect in interleukin-12-induced activation and interferon-g secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus.  
J Exp Med 190:963-972
95. PICCIRILLO CA, CHANG Y, PRUD'HOMME GJ (1998): TGF-beta 1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice.  
J Immunol 161:3950-3956
96. SCHLOOT NC, HANIFI-MOGHADDAM P, GOEBEL C, SHATAVI SV, FLOHE S, KOLB H, ROTHE H (2002): Serum IFN-gamma and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice.  
Diabetes Metab Res Rev 18:64-70
97. MARTIN S; WOLF-EICHBAUM D, DUINKERKEN G.,SCHERBAUM WA, KOLB H, NOORDZIJ JG, ROEP BO (2001): Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency.  
N Engl J Med 345:1036-1040
98. HÜTHER M (1997): Analyse der Produktion von Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin-4 und Interleukin-10 in peripheren Blutzellen von Patienten mit Typ 1 Diabetes.  
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
99. ROTHE H, HAUSMANN A, CASTEELS K, OKAMURA H, KURIMOTO M; BURKART V; MATHIEU C, KOLB H (1999): IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis.  
J Immunol 163:1230-1236

## **8. ANHANG**

### **8.1 Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
a.u.	arbitrary units
BB	BioBreeding
Beh.	Behandlung
BLU	Boehringer Light Unit <sup>®</sup>
Bom	Bomholtgard
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAM	Cellular Adhesion Molecule
cDNA	complementary DNA
CSF	Colony Stimulating Factor
CMV	Cytomegalievirus
CY	Cyclophosphamid
DAB	Diaminobenzidin
DDZ	Deutsches Diabetes Forschungszentrum
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA <sub>v</sub>	DNA-Vakzinierungsstudie
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zelle
E <sub>260nm</sub>	Extinktion bei 260 nm
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EtOH	Ethanol
GAD	Glutamatdecarboxylase
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue

---

Hrsg.	Herausgeber
HLA	Human Lymphocyte Antigen
Hsp	Heat Shock Protein
IAA	Insulin Autoantibody
ICA	Islet Cell Antibody
ICAM	Intercellulat Adhesion Molecule
<i>idd gene</i>	<i>insulin dependent diabetes gene</i>
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kD	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LB-Medium	<i>Laura Broth</i> -Medium
LFA	Lymphozytenfunktions-Antigen
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MQ	“Milli-Q”- Reagenzwasser
NMS	Normales Maus Serum
NK	Natürliche Killerzellen
NOD	non obese diabetic
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDNA	Plasmid DNA
RNA	Ribonukleinsäure

---

RSV	Rous Sarkoma Virus
RT	Reverse Transkription
s.c.	subcutan
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat Crystal
SS	Signalsequenz
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helfer
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche

## 8.2 Danksagung

Herr Prof. Dr. Hubert Kolb, ich danke Ihnen herzlich für die Bereitstellung des Themas in Ihrer Arbeitsgruppe Immunbiologie am Deutschen Diabetes Forschungszentrum (DDZ) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Ich danke für die Diskussionsbereitschaft während meiner praktischen Tätigkeit am DDZ und die fachlichen Anregungen zum Gelingen meiner Doktorarbeit. Besonders bedanke ich mich für die engagierte Unterstützung und die Korrekturen zur Fertigstellung meiner Dissertation.

Herr Prof. Dr. Manfred Reinacher, vielen Dank für die Vertretung meiner Doktorarbeit am Institut für Veterinär-Pathologie (Fachbereich Veterinärmedizin) der Justus-Liebig-Universität in Giessen.

Dr. Stephan Martin möchte ich für die Zusammenarbeit am DDZ und die Betreuung während der Vakzinierungsstudie herzlich danken. Ein ganz fröhlicher Dank geht an Dr. Natasja van den Engel. Wir haben mit viel Freude gemeinsam die Vakzinierungsstudie durchgeführt und ich habe stets Deine Verlässlichkeit, Deine Hilfe bei der Einarbeitung in die Thematik und Deine gute Laune geschätzt.

Ich möchte mich bei Dr. Stefanie Flohé für die Betreuung während meiner praktischen Arbeit zur Darmstudie bedanken. Es hat mir viel Freude bereitet in Deiner Arbeitsgruppe am DDZ mitzuarbeiten. Ein ganz besonderer Dank geht an Jutta Brüggemann. Du hast mir stets mit großem Bemühen zur Seite gestanden und mich in zahlreiche Labortechniken eingearbeitet. Ich habe die nette Arbeitsatmosphäre mit Dir sehr genossen, v.a. unsere Diskussionen, die weit über die Grenzen der Wissenschaft hinausgingen.

Dir, liebe Angela Schraven, danke ich für Deine Herzlichkeit und Mühe mich in allen Belangen zu unterstützen. Du hast mich jederzeit mit hilfreichen Ratschlägen und Deiner Besonnenheit motivieren können. Ich freue mich sehr, dass sich eine sehr inspirierende Freundschaft aus unserer Zusammenarbeit am DDZ entwickelt hat.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen (in alphabetischer Reihenfolge!) herzlich bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und die mir meine

Tätigkeit im Deutschen Diabetes Forschungszentrum zu einer wertvollen Zeit gemacht haben: Prof. Dr. Volker Burkart, Waltraud Fingberg, Reiner Fütth, Gabi Gornitzka, Christiane Habich, Pejman Hanifi-Moghaddam, Dr. Manfred Kauer, Philipp Rating, Bettina Rose, Robert Rümenapf, Seerin Shatavi, Dr. Nanette Schloot, Annette Schober, Rita Schreiner, Bettina Schulte, Simon Schimmack, Lilli Uebber, Tanja Wader und Dr. Markus Walz.

Andrea Clauswitz, Sybille Esser, Stefanie Hebar und Dr. Hans- Joachim Partke danke ich für die Zusammenarbeit im Tierlabor, die Unterstützung bei der Betreuung der Labortiere und für die Bereitschaft, Anregungen und Hilfestellungen von meiner Seite und im Sinne der Tiere anzunehmen.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle den Labormäusen danken, die sich, wenn auch unfreiwillig, in den Dienst der Forschung gestellt haben.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5201-3



9 7 8 3 8 3 5 9 5 2 0 1 0