



Kinderklinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar

- Forschergruppe Diabetes -
der Technischen Universität München
und

Institut für Diabetesforschung der Forschergruppe Diabetes e.V. am
Helmholtz Zentrum München

Univ.-Prof. Dr. A.G. Ziegler

Lehrstuhl für Diabetes und Gestationsdiabetes der Technischen Universität München

**Verifikation und Charakterisierung
von diabetogenen CD8+ T-Zellepitopen
im RIP-CD80+GP+ Mausmodell
für induzierbaren Autoimmundiabetes**

Helena Buhmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A.G. Ziegler
2. Univ.-Prof. Dr. R.M. Schmid

Die Dissertation wurde am 16.12.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.03.2017 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	2
1.3 Grundlagen des Diabetes mellitus	4
1.3.1 Grundlagen des Typ 1 Diabetes	5
1.4 Grundlagen dieser Arbeit	8
1.4.1 Dendritische Zellen im Typ 1 Diabetes	8
1.4.2 T-Zellen im Typ 1 Diabetes	9
1.4.3 Tiermodelle des Typ 1 Diabetes	10
1.4.4 Verwendetes Tiermodell	11
1.4.5 Diabetogene Peptide	12
2 Material und Methoden	15
2.1 Mausmodelle	15
2.1.1 C57BL/6-RIP-CD80+ Mäuse	15
2.1.2 C57BL/6-RIP-GP+ Mäuse	15
2.1.3 C57BL/6-RIP-CD80+GP+ Mausmodell	16
2.1.4 Spendermäuse für die Isolation der BM-DC	16
2.1.5 Herkunft und Zucht der Versuchstiere	17
2.1.6 Haltung und Hygiene	17
2.1.7 Alter und Beobachtungszeitraum	18
2.1.8 Anzahl und Aufteilung der Versuchstiere	18

2.1.9	Überwachung und Kontrolle der Versuchstiere	20
2.2	Verwendete Peptide/CD8+ T-Zellepitope	21
2.2.1	Allgemein	21
2.2.2	Eigenschaften der Peptide und Anleitung zur Herstellung der Peptidlösungen	22
2.2.3	SYFPEITHI	29
2.3	Verifikation von diabetogenen CD8+ T-Zellepitopen	29
2.3.1	Zellimmunisierung	29
2.3.2	Reife dendritische Zellen aus dem Knochenmark	30
2.3.3	Isolation und Kultivierung der BM-DC	32
2.3.4	Peptidinkubation und Injektion der BM-DC	33
2.3.5	Alternative Applikationsverfahren: Peptidimmunisierungen . .	33
2.4	Charakterisierung der diabetogenen CD8+ T-Zellepitope	35
2.4.1	Allgemeines	35
2.4.2	Verwendete Zelllinie	36
2.4.3	Verarbeitung der Zellen	36
2.4.4	Analytische Durchflusszytometrie	38
2.4.5	Verwendete Antikörper zum Zellstaining	39
2.4.6	Fluoreszenzfärbung der Zellen mit anti-Db-PE, 2.4G2 und 7AAD	40
2.4.7	Durchflusszytometrische Analyse der Zellen mittels FACS-Calibur	40
2.5	Genotypisierung der RIP-CD80+GP+ Mäuse	42
2.5.1	Allgemeines	42
2.5.2	DNA-Isolation	42
2.5.3	Amplifikation der isolierten DNA mittels PCR	43
2.5.4	Analyse und Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese	44
2.6	Übersicht: Häufig verwendete Medien, Reagenzien und Geräte	46
2.6.1	Häufig verwendete Medien	46
2.6.2	Häufig verwendete Reagenzien	48
2.6.3	Häufig verwendete Geräte	54
2.7	Statistik	55

3	Ergebnisse	57
3.1	Zellimmunisierungen	57
3.1.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	57
3.1.2	Übersicht zu den Versuchsergebnissen der Zellimmunisierungen am HMGU	59
3.1.3	Zellimmunisierungen mit den Kontrollpeptiden: LCMV-GP 33-41 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2	59
3.1.4	LCMV-GP 33-41: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH	61
3.1.5	Zellimmunisierungen mit den Kontrollpeptiden: LCMV-GP 276-286 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2	64
3.1.6	LCMV-GP 276-286: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH	65
3.1.7	Zellimmunisierungen mit den Kontrollpeptiden: LCMV-NP 396-404 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2	65
3.1.8	LCMV-NP 396-404: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH	68
3.1.9	Zellimmunisierungen mit den potentiell diabetogenen Peptiden: FNL 9 HMGU Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2	68
3.1.10	FNL 9: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH	70
3.1.11	Zellimmunisierungen mit den potentiell diabetogenen Peptiden: IGRP 241-249 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2	72
3.1.12	IGRP 241-249: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH	73
3.1.13	Zellimmunisierungen mit den potentiell diabetogenen Peptiden: mIGRP 225-233 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2	74
3.1.14	mIGRP 225-233: HMGU, Versuch 1+2 vs. NIH	76
3.1.15	Diabetesraten bezogen auf die Geschlechter- und Altersverteilung: HMGU vs. NIH	79
3.2	Analyse alternativer Peptidapplikationsmethoden: Optimierung des Zeitbedarfs für die CD8+ T-Zellverifikationen	84
3.3	Ergebnisse der Genotypisierung der RIP-CD80+GP+ Mäuse	89
3.3.1	Allgemeines	89
3.3.2	Ergebnisse der Genotypisierung	92
3.4	Ergebnisse des Peptidbindungsverhaltens mittels FACS-Analyse	92
3.4.1	Allgemeines	92

3.4.2	Ergebnisse der FACS-Analyse	93
4	Diskussion	97
4.1	Zellimmunisierungen im RIP-CD80+GP+ Mausmodell	97
4.2	Alternative Peptidapplikationsmethoden im RIP-CD80+GP+ Mausmodell	101
4.3	Charakterisierung des Peptidbindungsverhaltens	102
4.4	Ausblick	103
5	Zusammenfassung	105
	Abbildungsverzeichnis	109
	Literaturverzeichnis	111
	Publikationsliste	125
	Curriculum Vitae	127
	Danksagung	129

Abkürzungsverzeichnis

ADA: American Diabetes Association

Aqua a.i.: Aqua ad iniectabilia

BM-DC: Bone-marrow derived dendritic cells, bzw. aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen

BSA: Bovine serum albumin, bzw. bovines Serumalbumin

CD4, 8, 25: Cluster of differentiation 4, 8, 25, entspricht Oberflächenmarkern auf T-Zellen

CD80: Cluster of differentiation 80, entspricht dem kostimulatorischen Molekül B7-1

dATP: Deoxyadenosin-Triphosphat

dCTP: Deoxycytosin-Triphosphat

DDG: Deutsche Diabetes Gesellschaft

dGTP: Deoxyguanosin-Triphosphat

DM pos.: Diabetes mellitus positiv

DMK: Dystrophia-Myotonica-Kinase

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

dNTP: Deoxynukleotid-Triphosphat

dTTP: Deoxytyrosin-Triphosphat

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

EtBr: Ethidiumbromid

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting, bzw. fluoreszenzaktivierte Durchflusssy-tometrie

FBS: Fetal bovine serum, bzw. fötales bovines Serum

FCS: Fetal calve serum, bzw. fötales Kälberserum

- FITC: Fluoresceinisothiocyanat
- FOXP3: Transkriptionsfaktors FOXP3 (Forkhead box protein 3)
- FSC: Foreward scatter, bzw. Vorwärtsstreulicht-Kanal
- GAD: Glutamatdecarboxylase
- GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, bzw. Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
- H₂O: Wasser
- HMGU: Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH
- i.p.: Intraperitoneal
- i.v.: Intravenös
- IA-2: Insulinoma-Antigen 2
- IAA: Insulinautoantikörper
- ICA: Inselzellantikörper
- IGRP: Das der katalytischen Untereinheit der Insel-spezifischen Glukose-6-Phosphatase verwandte Protein
- LADA: Latent autoimmune diabetes in adults
- LCMV-GP: Glykoprotein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus
- LCMV-NP: Peptid aus dem LCMV-Nukleoprotein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus
- LPS-E.coli: Lipopolysaccharide aus Escherichia coli
- MgCl₂: Magnesiumchlorid
- MHC: Major Histocompatibility Complex, bzw. Haupthistokompatibilitätskomplex
- MW: Mittelwert (arithmetisches Mittel)
- NaCl: Natriumchlorid
- NaOH: Natriumhydroxid
- NEAA: Non-essential amino acids, bzw. nicht-essentielle Aminosäuren
- NIH: National Institutes of Health
- NOD-Maus: Non-Obese Diabetic Mouse
- PBS: Phosphate buffered saline, bzw. Pufferlösung
- PCR: Polymerase chain reaction, bzw. Polymerasekettenreaktion
- PE: Phycoerythrin

PI: Propidiumiodid

PSG: Penicillin-Streptomycin-Glutamin

RIP: Rat insulin promoter, bzw. Ratteninsulinpromoter

RNA: Ribonukleinsäure

rpm: Rounds per minute, bzw. Umdrehungen pro Minute

RPMI: Zellkulturmedium, wurde von Moore et. al. am Roswell Park Memorial Institute entwickelt, daher das Akronym RPMI

s.c.: Subkutan

SDS: Sodiumdodecylsulfat

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

SSC: Side scatter, bzw. Seitwärtsstreulicht-Kanal

SYFPEITHI: Online-Datenbank (www.syfpeithi.com) zur Vereinfachung der wissenschaftlichen Suche nach Informationen zu bestimmten Peptiden und der Vorhersage von T-Zellepitopen

T1D: Typ 1 Diabetes

Taq: Taq DNA Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*

TBE-Laufpuffer: TRIS-Borat-EDTA-Puffer

TgCD80: Transgene C57BL/6J-RIP-CD80(= B7-1)-Mäuse

TgGP: Transgene C57BL/6J-RIP-LCMV-GP-Mäuse

Th1-Zelle: T-Helferzelle Typ 1

Th2-Zelle: T-Helferzelle Typ 2

Tris-HCl: Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid

ZnT8: Insel-spezifischer Zinktransporter 8

7AAD: 7-Amino-Actinomycin D

1

Einleitung

1.1 Einleitung

Typ 1 Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer Zerstörung der Insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas durch das körpereigene Immunsystem kommt (Gepts 1981). Es handelt sich um eine T-Zell-vermittelte β -Zell-Destruktion, die im Verlauf zu einem absoluten Insulinmangel und damit zur klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes führt (Pinkse 2005; Monti 2007). Die genetische Prädisposition hat Einfluss auf die Entstehung des Typ 1 Diabetes (Orešič 2008; Howson 2009). Da die genetische Veranlagung aber nicht zwingend zur Entwicklung eines Typ 1 Diabetes führt, geht man davon aus, dass zusätzliche Auslöser das Krankheitsgeschehen triggern. Umweltfaktoren wie Virusinfektionen oder Ernährungsbedingungen werden diskutiert (Füchtenbusch 1995).

Schon bevor sich Diabetes manifestiert, können sowohl im Menschen als auch im Tiermodell Autoantikörper detektiert werden, die gegen Inselautoantigene gerichtet sind. Die Messung dieser Autoantikörper ist hervorragend geeignet, um individuelle Risiko- prognosen zu erstellen (Achenbach 2004b; Achenbach 2005). Jedoch ist es bis heute nicht möglich, die Krankheitsentwicklung oder -modulation durch direkte Messung der autoreaktiven T-Zellen zu verfolgen (Nagata 2004).

Im transgenen C57BL/6-RIP (Ratteninsulinpromoter)-CD80+ Mausmodell ist es möglich, Autoimmundiabetes antigenspezifisch zu induzieren (Harlan 1994). RIP-CD80+

Mäuse exprimieren das kostimulatorische CD80(=B7-1)-Molekül auf den pankreatischen β -Zellen, was sie empfänglich für einen Angriff von Immunzellen macht. Folglich führen verschiedenste Immunisierungsarten mit Agenzien, die eine Immunreaktion gegen in den β -Zellen exprimierte Proteine auslösen, zur β -Zellzerstörung und Diabetesentwicklung in RIP-CD80+ Mäusen (Harlan 1995; v. Herrath 1995; Karges 2002; Rajasalu 2004). Diese Eigenschaften spiegeln die vermutete Situation im Menschen wider: das Vorliegen von genetischen Merkmalen, die mit einer hohen Empfindsamkeit für Autoimmundiabetes einhergehen, und ein exogener Faktor, der die Krankheitsentstehung triggert, um die Autoimmunkaskade, die zur Diabetesentwicklung führt, in Gang zu setzen. Das Glykoprotein aus dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV-GP) kann als experimentelles β -Zellautoantigen benutzt werden (Modellantigen/Positivkontrolle), wenn es ebenfalls transgen unter dem Ratteninsulinpromoter in den pankreatischen β -Zellen exprimiert wird (Ohashi 1991). Immunisierungen mit dem dominanten (LCMV-GP 33-41) und dem subdominanten (LCMV-GP 276-286) zytotoxischen Epitop, die im LCMV-GP Modellantigen translatiert werden, führen zur β -Zellzerstörung und zur Diabetesmanifestation in RIP-CD80+GP+ Mäusen. Als Negativkontrolle dient das Kontrollpeptid LCMV-NP 396-404. Das bitransgene Mausmodell RIP-CD80+ x RIP-GP+ wurde seit mehr als zehn Jahren sehr detailliert studiert, um die Grundlagen des Autoimmundiabetes und der auftretenden autoimmunen T-Zellreaktion zu analysieren (Pechhold 2001; Pechhold 2003; Pechhold 2007).

1.2 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Bereits in der präklinischen Phase des Autoimmundiabetes sind Inselautoantigen-spezifische Autoantikörper nachweisbar. Jedoch ist es bis dato noch nicht gelungen, die Krankheitsentwicklung oder -modulation des Autoimmundiabetes durch die direkte Messung der autoreaktiven T-Zellen zu untersuchen.

Viele Beschränkungen vorhergegangener Studien mit humanen Blutproben können mittels Autoantigen-induzierbaren Mausmodellen überwunden werden. Autoimmundiabetes kann in RIP-CD80+GP+ Mäusen antigenspezifisch ausgelöst werden. Es wurde gezeigt, dass durch die Sensibilisierung mit einem einzigen Modellantigenepitop ei-

ne starke T-Zell-vermittelte pankreatische Inselentzündung und die Entwicklung von Diabetes in RIP-CD80+GP+ Mäusen auslösbar sind (Pechhold 2001; Pechhold 2003; Pechhold 2007).

In der Literatur wurden verschiedenste Peptide beschrieben, die eine relevante Rolle als T-Zellepitope in der Diabetes-assoziierten Autoimmunität spielen (DiLorenzo 2007). Allerdings wurde bis heute noch kein zuverlässiges Modell entwickelt, um diese Epitope *in vivo* zu überprüfen und zu verifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher mithilfe des RIP-CD80+GP+ Mausmodells für induzierbaren Autoimmundiabetes die Diabetesrelevanz von bereits beschriebenen, potentiell diabetogenen Autoantigen-Epitopen *in vivo* verifiziert und charakterisiert werden. Es werden die Autoantigen-Epitope aus dem Protein DMK = Dystrophia-Myotonica-Kinase (hier verwendet Epitop „FNL9“) (Lieberman 2004) und dem der katalytischen Untereinheit der Insel-spezifischen Glukose-6-Phosphatase verwandten Protein (hier verwendet IGRP 241-49 und mIGRP 225-233) ebenso wie die Kontrollpeptide (LCMV-GP 33-41 = Modellantigen/Positivkontrolle und LCMV-NP 396-404 = Negativkontrolle) in verschiedenen Immunisierungstokollen verwendet.

Primär sollen für alle behandelten Mäuse die Diabetesfrequenzen dokumentiert werden. Darüber hinaus soll in *in vitro* Testverfahren das Bindungsverhalten der o.g. Peptide an die BM-DC bzw. deren MCH-Klasse 1 Allele untersucht werden. Zusätzlich soll analysiert werden, ob bei den verschiedenen Immunisierungsmethoden generell die gleichen Epitope Diabetes-relevant sind.

Die Ergebnisse der Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Helmholtz Zentrum München (HMGU) sollen auf folgende Fragen untersucht werden: Können die applizierten Peptide nebst der in der Literatur bereits beschriebenen Diabetogenität tatsächlich *in vivo* Diabetes auslösen? Gibt es Differenzen zwischen der in der Literatur beschriebenen Diabetogenität und unseren Ergebnissen? Gibt es Unterschiede in der Diabetogenität der einzelnen Peptide? Wie viele Tiere entwickeln in welchem Zeitraum Diabetes? Ist das Auftreten von Diabetes bzw. die Dynamik des Krankheitsverlaufs alters- oder geschlechtsabhängig? Korreliert die *in vivo* nachgewiesene Diabetogenität mit dem durchflusszytometrisch analysierten Bindungsverhalten der einzelnen Peptide an die MHC-Klasse 1 Moleküle? Sind die gleichen Epitope Diabetes-relevant?

Zusätzlich erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse der HMGU-Experimente mit Resulta-

ten aus Vorversuchen an den National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA (NIH, Animal Study Proposal #K127-TAB-03), um zu explorieren, ob auch in verschiedenen Räumlichkeiten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Reproduzierbarkeit der Versuchsreihe gegeben ist.

Die Ergebnisse dieser Studie könnten eine wichtige Rolle bei der Beobachtung der Krankheitsentstehung bei Kindern mit hohem Typ 1 Diabetesrisiko spielen und ein Mittel in der Nachverfolgung von immunmodulatorischen Therapien darstellen. Darüber hinaus könnten identifizierte Epitope als Antigen-spezifische Ziele für Immuntherapien benutzt werden, um die Typ 1 Diabetesentstehung zu verhindern.

1.3 Grundlagen des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus bezeichnet eine heterogene Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert ist. Es liegt entweder eine Störung der Insulinsekretion oder der Insulinwirkung oder eine Kombination aus beidem vor. Unbehandelt führt der Diabetes mellitus zu multiplen Langzeitfolgeschäden. Besonders betroffen sind dabei -ausgelöst durch die diabetesspezifische Mikroangiopathie- Augen (diabetische Retinopathie), Nieren (diabetische Nephropathie), Nerven (diabetische Neuropathie) und -bedingt durch die diabetesassoziierte Makroangiopathie- Blutgefäße (z.B. periphere arterielle Verschlusskrankheit), Herz (z.B. koronare Herzkrankheit) und Gehirn (z.B. zerebrovaskuläre Insuffizienz).

Nach der Klassifikation der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft wird der Diabetes mellitus anhand pathogenetischer Kriterien in 4 Gruppen unterteilt (ADA 2014):

1. Typ 1 Diabetes:

Durch eine β -Zellzerstörung kommt es zu absolutem Insulinmangel.

- Typ 1A: immunologisch vermittelte Form
- Typ 1B: idiopathische Form

2. Typ 2 Diabetes:

Typ 2 Diabetes ist charakterisiert durch eine gestörte Insulinsekretion und/oder eine Insulinresistenz.

3. Gestationsdiabetes:

Hierbei handelt es sich um eine erstmals während der Schwangerschaft diagnostizierte Glukosetoleranzstörung.

4. Andere spezifische Diabetes-Typen

1.3.1 Grundlagen des Typ 1 Diabetes

Typ 1 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine autoimmun bedingte, progrediente Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen in den Inseln des Pankreas mit daraus resultierendem Insulinmangel.

Klinik

Klinisch führt die Erkrankung zu den charakteristischen Leitsymptomen Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust (Leitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft, DDG 2004). Meist treten die Beschwerden plötzlich auf und können von mäßig erhöhten Blutzuckerwerten bis zum ketoazidotischen Koma reichen. Die Erkrankung tritt vorwiegend bei jungen Menschen auf, kann sich aber generell auch im späteren Lebensalter manifestieren. Hier spricht man von LADA (latent autoimmune diabetes in adults).

Einteilung

Es werden 2 Subtypen des Typ 1 Diabetes unterschieden:

1. Die immunologisch vermittelte Form (Typ 1A), bei der serologische Marker einer Autoimmunreaktion nachweisbar sind (Inselzellantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IAA), Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase der β -Zelle (GAD65A), Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase (IA-2A)). Nach Klassifikation der ADA wird auch der LADA dem Typ 1A Diabetes zugeordnet.
2. Die idiopathische Form (Typ 1B), bei der die Ätiopathogenese unbekannt ist und keine Autoimmunitätsmarker detektierbar sind.

Epidemiologie

Weltweit lässt sich eine Zunahme der Inzidenz des Typ 1 Diabetes von 3% pro Jahr beobachten, wenn auch z.T. deutliche geographische Unterschiede erkennbar sind (Onkamo 1999; EURODIAB 2000; Green 2001).

Die höchsten Inzidenzraten (>20 / 100 000 / Jahr) findet man in Finnland, Schweden, Norwegen, Grossbritannien, Sardinien, Portugal, Kanada und Neuseeland. China und Venezuela dagegen haben die niedrigsten Inzidenzen (0.1 / 100 000 / Jahr) (Karvonen 2000; Onkamo 1999).

Auch in Deutschland steigt seit Beginn der neunziger Jahre die Inzidenz jährlich um 3 bis 3.6% in der Altersgruppe von Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren an (Neu 2001; Rosenbauer 2002; Berner 2004).

Insgesamt sind weltweit etwa 490 100 Kinder im Alter von 0-14 Jahren an Typ 1 Diabetes erkrankt. Man rechnet damit, dass im Jahr 2011 etwa 70 800 Kinder im Alter von unter 15 Jahren neu einen Typ 1 Diabetes entwickeln werden (IDF 2011). Mehrere europäische Studien haben aufgezeigt, dass die Erkrankung, relativ gesehen, am stärksten bei jüngeren Kindern (Altersgruppe 0-4 Jahre) zunimmt (Scherbaum 2004).

Kosten

Die direkt Typ 1 Diabetes-assoziierten Kosten für das deutsche Gesundheitssystem betragen über 3500 Euro pro Patient und Jahr. In der Summe sind dies über 110 Millionen Euro pro Jahr. Verglichen mit Vorwerten aus dem Jahr 2000 konnten eine durchschnittliche Zunahme der Kosten pro Patient von 20% und eine Zunahme der Totalkosten von 47% beobachtet werden. Dies wird u.a. auf die Einführung neuer Therapiestrategien und die Zunahme der Diabetesprävalenz zurückgeführt (Bächle 2012).

Genetik

Die Prädisposition für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes wird polygen vererbt. Ergebnisse aus Zwillingsstudien zeigen eine kumulative Signifikanz von genetischen Eigenschaften zur Auslösung von Typ 1 Diabetes von 50-65% auf (Hauben 2001). Die Korrelation zwischen Empfänglichkeit zur Entwicklung eines Typ 1 Diabetes und bestimmten "Major Histocompatibility Complex-Klasse 2 (MHC-II) Allelen" (DR3-DQ2,

DR4-DQ8) steht in Verbindung mit dem höchsten Risiko zur Entstehung eines Typ 1 Diabetes (Todd 2007). Die MHC-II Moleküle sind im Immunsystem für die Präsentation von Antigenen gegenüber CD4+ T-Zellen verantwortlich. Bei etwa 70% der an Typ 1 Diabetes erkrankten Personen kann o.g. HLA-Risiko-Allel als stärkster genetischer Faktor nachgewiesen werden. Dagegen entwickeln jedoch nur 3-7% der Träger des HLA-Risikoallels einen manifesten Typ 1 Diabetes (Orešič 2008; Howson 2009). In den letzten Jahren wurden auch einige MHC-I Allele als genetische Risikofaktoren identifiziert. Mehr als 70 weiteren nicht-HLA Genen wird außerdem eine Erhöhung der Diabetessuszeptibilität zugesprochen (Barrett 2009).

Der Typ 1 Diabetes wird mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 3-5% von einem Elternteil auf ein Kind vererbt. Kinder von einem Elternteil mit Typ 1 Diabetes, die einen der risikoreichen HLA-Genotypen tragen, haben jedoch ein kumulatives Risiko von ca. 20%, bereits innerhalb der ersten 5 Lebensjahre eine Inselautoimmunität zu entwickeln. Sind beide Eltern an Typ 1 Diabetes erkrankt, steigt das Risiko der Kinder, Typ 1 Diabetes zu entwickeln, ebenfalls auf 10-25% an (Ziegler 1999; Walter 2003).

Bei einem an Typ 1 Diabetes erkrankten eineiigen Zwilling liegt das Risiko des anderen, bis dato nicht betroffenen Zwillings, auch einen Typ 1 Diabetes zu bekommen, bei 30-50% (Barnett 1981; Olmos 1988; Tuomilehto 2013).

Man geht aktuell davon aus, dass auf der Basis einer genetischen Prädisposition die autoimmune Reaktion schließlich durch exogene Faktoren ausgelöst wird. Eine große Anzahl an Umweltfaktoren, aber auch Virusinfektionen (wie z.B. eine Cocksackievirus-Infektion) werden als Trigger zur letztlichen Auslösung des Typ 1 Diabetes diskutiert (Füchtenbusch 1995). Die Ergebnisse aus verschiedenen Studien sind allerdings kontrovers.

Krankheitsentwicklung und Nachweis spezifischer Antikörper

Die Krankheitsentwicklung des Typ 1 Diabetes lässt sich vereinfacht in folgende Stadien unterteilen (Ziegler 1994; Achenbach 2008b):

1. Prä-Autoimmunität (genetische Prädisposition)
2. Auftreten von Insel-Autoimmunität
3. Progression der Insel-Autoimmunität mit Abnahme der β -Zellmasse und -funktion

4. Klinische Manifestation des Typ 1 Diabetes

5. Verlust der β -Zell-Restfunktion

Ein charakteristisches Merkmal in der präklinischen Phase von Typ 1 Diabetes ist der Nachweis von Autoantikörpern gegen β -Zell-Antigene im Blut der Betroffenen. Sie können bereits viele Jahre vor der eigentlichen Diabetesmanifestation im peripheren Blut nachgewiesen werden (Roll 1997; Atkinson 2001). Die relevantesten der nachweisbaren Autoantikörper sind spezifisch für die Iselautoantigene (Pro-)Insulin, die 65-kD-Isoform des Enzyms Glutamatdecarboxylase (GAD65) sowie Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 und IA-2 β und das neuerlich entdeckte Autoantigen Zink-Transporter 8 (ZnT8) (Achenbach 2008a). Damit ist die Detektion von Diabetes-assoziierten Autoantikörpern eine wichtige Untersuchungsmethode insbesondere zur Prädiktion und Erstellung individueller Risikoprognosen (Schlosser 2005; Koczwara 2007c; Achenbach 2007), aber auch zur Differentialdiagnostik des Typ 1 Diabetes (Verge 1996; Bingley 1997; Kulmala 1998; Ziegler 1999; Maclaren 1999).

1.4 Grundlagen dieser Arbeit

1.4.1 Dendritische Zellen im Typ 1 Diabetes

Reife dendritische Zellen fungieren als professionelle, Antigen-präsentierende Zellen im Immunsystem. Sie haben wichtige Funktionen in der Initiierung und Erhaltung der adaptiven Immunreaktion. Unlängst wurde erkannt, dass dendritische Zellen einen essentiellen Einfluss auf die Kontrolle und Regulation von T-Zellreaktionen haben (Pechhold 2008).

Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, Bruchstücke der in die Zelle aufgenommenen Antigene in ihre Zellmembran einzubauen und via MHC-Moleküle den Lymphozyten zu präsentieren. Für eine erfolgreiche Aktivierung werden zusätzliche kostimulatorische Signale benötigt. Das wichtigste kostimulatorische Molekül in der Zellmembran der dendritischen Zellen ist das Glykoprotein B7. Dieses interagiert mit dem CD28-Protein auf T-Zellen. Über die Antigenpräsentation durch die dendritischen Zellen und die Interaktion der o.g. kostimulatorischen Moleküle können folglich naive T-Zellen aktiviert werden.

Autoreaktive B- und T-Zellen werden bereits während ihrer Entstehung in Thymus und Knochenmark negativ selektiert. Insbesondere dendritische Zellen sind an der negativen Selektion autoreaktiver T-Zellen beteiligt. Vereinzelt erreichen einige autoreaktive Zellen auch die Peripherie. Mittels Anergie, Suppression, Antigensequestration und klonale Deletion können die autoreaktiven Zellen jedoch normalerweise unter Kontrolle gehalten werden. Es wird postuliert, dass eine Reduktion regulatorischer T-Zellen (s.u.), eine Änderung in der Physiologie der dendritischen Zellen sowie eine Veränderung der Interaktion von dendritischen Zellen und T-Zellen zu einem Zusammenbruch der Selbsttoleranz und folglich zur Entstehung von Autoimmunität führen können (Iruetagoiena 2006; Tang 2006).

Darüber hinaus werden viele weitere Faktoren als Ursache für die Entwicklung der Autoimmunität beim Typ 1 Diabetes diskutiert, wie z.B. eine verminderte Antigenpräsentation, die Unterdrückung von regulatorischen T-Zellen oder B-Zellen und die von ihnen produzierten Antikörper.

Durch die o.g. Eigenschaften stehen dendritische Zellen neuerdings im Zentrum der klinischen Forschung und der Grundlagenforschung. Im Rahmen von Typ 1 Diabetes wird versucht, mittels dendritischer Zellen die Induktion und Ausbreitung von regulativen und destruktiven T-Zellreaktionen zu manipulieren, um die β -zellspezifische Autoimmunreaktionen zu analysieren und therapeutisch zu modifizieren (Pechhold 2008).

1.4.2 T-Zellen im Typ 1 Diabetes

Die zelluläre Immunität wird durch die T-Zellen vermittelt. Als zentrale Aggressorzellen spielen die T-Zellen eine entscheidende Rolle im T1D. Generell können T-Zellen in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen unterteilt werden. CD4 und CD8 sind Korezeptormoleküle auf der Zelloberfläche der T-Zellen. Sowohl zytotoxische CD8⁺ T-Zellen als auch CD4⁺ T-Helferzellen sind in die Pathogenese des T1D involviert.

CD4⁺ T-Zellen sind u.a. an der Differenzierung der B-Zellen beteiligt. Ihre T-Zellrezeptoren erkennen an MHC-Klasse 2 Rezeptoren gebundene Antigene, welche ihrerseits von antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden. CD4⁺ T-Zellen lassen sich klassisch in 2 große Gruppen unterteilen: Th1-Zellen, welche u.a. Interleukin-2, Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ bilden. Sie sind wichtig für das Abtöten intrazellulärer Pathogene in Makrophagen, aber auch für die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen.

Die zweite Gruppe stellen die Th2-Zellen dar. Sie bilden u.a. Interleukin-3, -4, -5, -6, -10 und -13 und sind für die Aktivierung von B-Zellen und die Regulation der humoralen Immunität verantwortlich. Von ihnen spricht man als eigentliche T-Helferzellen. Auch können sie die entzündungsfördernden Funktionen der Th1-Zellen bremsen (Murphy 2009). Regulatorische T-Zellen, welche sowohl CD4 als auch CD25 und den Transkriptionsfaktor FOXP3 exprimieren, spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von T1D, da sie normalerweise der Selbstkontrolle des Immunsystems dienen und dafür verantwortlich sind, Autoimmunität zu unterbinden (Asano 1996; Mellanby 2009).

CD8+ T-Zellen erfassen an MHC-Klasse 1 Rezeptoren gebundene Antigene und haben (wie auch ein kleiner Teil der CD4+ T-Zellen) zytotoxische Aktivität (z.B. mittels Perforin, Defensin, Granzym, Fas-Liganden aber auch Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ). Ein Teil der CD8+ T-Zellen wird als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie greifen insbesondere intrazellulär gelegene Viren, Bakterien und z.T. parasitäre Protozoen (wie z.B. *Toxoplasma gondii*) an. Eine weitere Gruppe von CD8+ T-Zellen hat immunregulatorische Funktionen (Murphy 2009).

1.4.3 Tiermodelle des Typ 1 Diabetes

In der Diabetesforschung sind Tiermodelle eine seit langem bestehende und etablierte Methode zur Untersuchung der pathogenetischen Mechanismen des Typ 1 Diabetes (Wong 1999a). Durch die Möglichkeit des Einsatzes transgener Mausmodelle mit teils humanisiertem Genom können nun auch einige Ergebnisse, die aus den Versuchen gewonnen werden konnten, auf den Menschen übertragen werden (Taneja 1999). Der Typ 1 Diabetes im Tiermodell wird nach seiner Genese in zwei Kategorien eingeteilt: den spontanen und den induzierten Diabetes (Karges 1995). Bei den Tiermodellen, die spontan Diabetes entwickeln, liegt eine genetische Prädisposition vor. Bekannte Modelle sind die NOD-Maus (Makino 1980) und die Wistar-BB-Ratte (Nakhoda 1977). Da die NOD-Maus ähnliche genetische Defekte sowie die gleichen Autoantigene (z.B. GAD65 (Kaufman 1993), IA-2 (Myers 1998) und Insulin (Wegmann 1994)) wie im Menschen aufweist, ist ihr Einsatz weit verbreitet. Der induzierbare Diabetes kann im Tiermodell unter anderem durch bestimmte Immunisierungen, z.B. mit einem bestimmten Peptid des 60 kDa Hitzeschockproteins (Elias 1995), durch den Transfer von diabetogenen Zellen (Ylinen 2000), iatrogen durch chirurgische Pankreasexplantation, über die In-

fektion mit bestimmten Viren, wie dem Enzephalomyocarditis-Virus (Buschard 1983), oder durch die Gabe diabetogener Medikamente, wie den Nitrosamiden Streptozotolin und Chlorozotolin oder dem Amin Alloxan, ausgelöst werden.

1.4.4 Verwendetes Tiermodell

In der vorliegenden Arbeit wird das bitransgene C57BL/6-RIP- (Ratteninsulinpromoter) CD80+GP+ Mausmodell verwendet (Harlan 1994). Hier ist es möglich, Autoimmundiabetes antigenspezifisch zu induzieren. RIP-CD80+ Mäuse exprimieren das kostimulatorische CD80- (=B7-1) Molekül auf den pankreatischen β -Zellen, was sie empfänglich für einen Angriff von Immunzellen macht. Folglich führen verschiedenste Immunisierungsarten mit Agenzien, die eine Immunreaktion gegen in den β -Zellen exprimierten Proteinen auslösen, zur zuverlässigen β -Zellzerstörung und Diabetesentwicklung in RIP-CD80+ Mäusen. Diese Eigenschaften spiegeln die vermutete Situation im Menschen wider: das Vorliegen von genetischen Merkmalen, die mit einer hohen Empfindlichkeit für Autoimmundiabetes einhergehen, und ein exogener Faktor, der die Krankheitsentstehung triggert, um die Autoimmunkaskade, die zur Diabetesentwicklung führt, in Gang zu setzen.

Das Glykoprotein aus dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV-GP) kann als experimentelles β -Zell-Autoantigen benutzt werden (Modellantigen / Positivkontrolle), wenn es ebenfalls transgen, unter dem Ratteninsulinpromoter in den pankreatischen β -Zellen exprimiert wird (Ohashi 1991). Immunisierungen mit dem dominanten (LCMV-GP 33-41) und dem subdominanten (LCMV-GP 276-286) zytotoxischen Epitop, die im LCMV-GP Modellantigen translatiert werden, führen zur β -Zellzerstörung und zur Diabetesmanifestation in RIP-CD80+GP+ Mäusen. Als Negativkontrolle dient das Kontrollpeptid LCMV-NP 396-404 (Nucleoprotein des Lymphozytären Choriomeningitisvirus).

Das bitransgene Mausmodell RIP-CD80+GP+ wurde seit mehr als zehn Jahren sehr detailliert studiert, um die Grundlagen des Autoimmundiabetes und der auftretenden autoimmunen T-Zellreaktion zu analysieren.

1.4.5 Diabetogene Peptide

In der Literatur wurden verschiedenste Peptide beschrieben, die möglicherweise eine relevante Rolle als T-Zellepitope in der Diabetes-assoziierten Autoimmunität spielen (DiLorenzo 2007). Allerdings wurde bis heute noch kein zuverlässiges Modell entwickelt, um dies *in vivo* zu bestätigen. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher mithilfe des RIP-CD80+GP+ Mausmodells (Harlan 1994) für induzierbaren Autoimmundiabetes die Diabetesrelevanz von bereits beschriebenen, potentiell diabetogenen Autoantigen-Epitopen *in vivo* analysiert.

Untersucht werden hierzu 3 ausgewählte Peptide: FNL 9 aus der DMK = Dystrophia-Myotonica-Kinase (Lieberman 2004) und aus dem der katalytischen Untereinheit der Insel-spezifischen Glukose-6-Phosphatase verwandten Protein die Peptide IGRP 241-249 und mIGRP 225-233 (Takaki 2006; Ouyang 2006).

Dazu werden verschiedene Immunisierungsprotokolle angewendet:

Einerseits werden die Peptide FNL 9, IGRP 241-249 und mIGRP 225-233, ebenso wie die Kontrollpeptide (LCMV-GP 33-41 = Modellantigen bzw. Positivkontrolle, LCMV-GP 276-286 = subdominante Positivkontrolle und LCMV-NP 396-404 = Negativkontrolle) als exogene Antigene auf murine, reife, aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen (BM-DC) geladen, sodass eine sehr sensitive Aktivierung des Immunsystems ausgelöst wird.

Andererseits werden direkte Peptid-Immunisierungen mit dem Kontrollpeptid LCMV-GP 33-41 = Modellantigen bzw. Positivkontrolle in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, mit dem Ziel einer generellen Immunreaktion mit Adressierung aller Immunzellen.

Zusätzlich soll analysiert werden, ob bei beiden Immunisierungsmethoden generell die gleichen Epitope Diabetes-relevant sind. Falls die verifizierten diabetogenen T-Zellepitope auch ohne die sehr sensitive Methode der Beladung auf BM-DC ihre Diabetesrelevanz beibehalten, könnte eine wesentlich schnellere und weniger aufwändige Methode zur Verwendung des RIP-CD80+GP+ Mausmodells für die *in vivo*-Verifikation und Charakterisierung von diabetogenen CD8 T-Zellepitopen etabliert werden.

In einer Studie von Pechhold (Pechhold 2007) konnte gezeigt werden, dass die Diabetogenität von spezifischen Peptiden unter anderem von deren Bindungsaffinität an

MHC-Klasse 1 Moleküle abhängt. Um dieses Verhalten an den von uns verwendeten o. g. Peptiden zu überprüfen, werden mittels der humanen Lymphoblasten-Zelllinie "T2", die transgen murine MHC Klasse 1 H-2Db Moleküle synthetisiert, das Bindungsverhalten der jeweiligen Epitope an die MHC-Klasse 1 Moleküle untersucht. Neben den Bindungscharakteristika der einzelnen Peptide wird untersucht, ob die jeweilige Bindungsaffinität mit der *in vivo* gemessenen Diabetesrelevanz korreliert. Darüber hinaus erfolgt ein Vergleich der Bindungseigenschaften der individuellen Peptide in Relation zueinander.

2

Material und Methoden

2.1 Mausmodelle

2.1.1 C57BL/6-RIP-CD80+ Mäuse

Alle in den folgenden Versuchen verwendeten Mäuse haben den genetischen C57BL/6-(H-2Db) Hintergrund. RIP-CD80+ Mäuse exprimieren unter Kontrolle des Ratteninsulinpromoters (RIP) das kostimulatorische Molekül CD80 (=B7-1) auf den pankreatischen β -Zellen. B7-1 gehört zu einer Familie von Rezeptoren auf spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen, die Major-Histokompatibilitätskomplex-Moleküle Klasse 1 und 2 exprimieren können, und interagiert mit dem CD28-T-Lymphozyten-Rezeptor. Diese Interaktion wird als kostimulatorisches Signal für die T-Zell-Aktivierung benötigt. Durch Expression von CD80 auf den β -Zellen werden diese sehr empfänglich für den Angriff von Immunzellen. Daher führen verschiedenste Immunisierungsarten, die eine spezifische Immunreaktion gegen β -Zellantigene induzieren, sehr effektiv zur β -Zellzerstörung und somit zur Diabetesentwicklung.

2.1.2 C57BL/6-RIP-GP+ Mäuse

Bei den C57BL/6-RIP-GP+ Mäusen wird das Glykoprotein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV-GP) ebenfalls transgen unter dem RIP und folglich ausschließlich auf den pankreatischen β -Zellen exprimiert. Infiziert man diese Mäuse mit

dem LCM-Virus, führt die antivirale Immunantwort zu einer Zerstörung der β -Zellen (Ohashi 1991) und zur Diabetesinduktion.

2.1.3 C57BL/6-RIP-CD80+GP+ Mausmodell

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wird das bitransgene C57BL/6-RIP-CD80+GP+ Mausmodell für Autoantigen-spezifisch-induzierbaren Diabetes verwendet (Harlan 1994). Die bitransgenen Mäuse wurden durch Kreuzung von monotransgenen RIP-CD80+ mit monotransgenen RIP-GP+ Mäusen des genetischen Stamms der C57BL/6-Mäuse (H-2Db) gezüchtet. Im Gegensatz zu der NOD-Maus tritt bei dem RIP-CD80+GP+ Mausmodell Diabetes nur sehr selten spontan auf. Die bitransgenen RIP-CD80+GP+ Mäuse exprimieren sowohl das kostimulatorische Molekül CD80 als auch das Glykoprotein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV-GP) unter Kontrolle des Ratteninsulinpromoters auf den Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas. Mit der CD80-Expression haben die Mäuse einerseits eine außergewöhnlich hohe Empfänglichkeit für die Entwicklung von Autoimmundiabetes nach Autoantigen-spezifischer Induktion, sodass mit diesem Modell potentiell diabetogene Autoantigen-Epitope auf ihre Diabetesrelevanz überprüft werden können. Andererseits ist durch Expression des GP-Transgens die Möglichkeit der Positivkontrolle für die durchzuführenden Versuche und die Bestätigung der Effizienz des Mausmodells für induzierbaren Autoimmundiabetes gegeben. Durch Immunisierungen mit dominanten (LCMV-GP 33-41) bzw. subdominanten (LCMV-GP 276-286) CD8+ T-Zell-restringierten Epitopen des LCMV-GP-Proteins wird in dem bitransgenen C57BL/6-RIP-CD80+GP+ Mausmodell effizient eine Immunreaktion induziert, die sich spezifisch gegen die β -Zellen richtet und sie zuverlässig zerstört. LCMV-GP dient in den folgenden Versuchen als ein experimentelles β -Zellautoantigen als Referenz (= Modellantigen).

2.1.4 Spendermäuse für die Isolation der BM-DC: B6.129S7-Rag1 tm1Mom/J Mausmodell

Als Spendertiere für die Isolation der BM-DC, die für die Zellimmunsierungen benötigt wurden, dienten weibliche B6.129S7-Rag1 tm1Mom/J-Mäuse. Sie haben ebenfalls den genetischen Hintergrund der C57BL/6 Mäuse (H-2Db) und die Weibchen tragen

zwei X-Chromosomen, sodass ein syngener Zelltransfer erfolgen konnte und keine Abstoßungsreaktionen im weiblichen oder männlichen Rezipienten ausgelöst wurden, was andernfalls die geplanten Untersuchungen beeinflusst hätte. Durch eine homozygote Mutation im Rag1-Gen können die Tiere keine reifen T- oder B-Zellen bilden. Damit ist die Isolation von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark sehr effizient und nicht von Verunreinigungen mit T- oder B-Zellen betroffen. Aufgrund der fehlenden reifen T- und B-Zellen sind die Tiere immundefizient und konnten in den vorhandenen Tierställen nicht gehalten werden. Daher wurden die Mäuse zum benötigten Zeitpunkt separat zugekauft und umgehend verwendet.

2.1.5 Herkunft und Zucht der Versuchstiere

Für die Versuche im RIP-CD80+GP+ Mausmodell wurden Mäuse aus eigener Zucht am Helmholtz Zentrum München mittels Kreuzung der C57BL/6-RIP-GP+ Mäuse mit den C57BL/6-RIP-CD80+ Mäusen verwendet. Die ursprünglichen 2 Zuchtpaare der C57BL/6-RIP-GP+ Mäuse stammen von Dr. David Harlan, NIH (NIDDK, Diabetes Branch). Von Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck, Universitätsklinikum Ulm, wurden 2 Zuchtpaare der C57BL/6-RIP-CD80+ Mäuse an das Helmholtz Zentrum München transferiert.

Die B6.129S7-Rag1 tm1Mom/J-Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (#002216) zugekauft.

2.1.6 Haltung und Hygiene

Alle Mäuse wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen in klimatisierten Räumen (Helmholtz Zentrum München) gehalten. Zu dem Haltungsbereich hatte ausschließlich geschultes Personal in Schutzkleidung (Kittel, Mundschutz, Haarnetz, Überschuhe und Handschuhe) über eine Umkleide als Schleuse Zutritt. Die Versuchstiere wurden in Typ-II-Käfigen gehalten, und die Anzahl der Mäuse pro Käfig entsprach der EU-Richtlinie über die "Bestandsdichte in Vorratshaltung und Versuchen" vom 30.07.2007. Trinkwasser und herkömmliches Nagetierfutter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden.

Für alle Tierexperimente wurden die Prinzipien für die Versorgung von Tieren (NIH

Publikation Nr. 85-23, überarbeitet 1985) und die nationalen Tierschutzgesetze befolgt. Die Tierversuche wurden durch den Bescheid der Regierung von Oberbayern vom 05.06.2009 unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-154-08 genehmigt.

2.1.7 Alter und Beobachtungszeitraum

Für alle Versuche wurden Mäuse im adulten Alter von etwa 8 bis 16 Lebenswochen verwendet. Der Beobachtungszeitraum der Mäuse betrug 20 Wochen nach der Immunisierung. Alle Tiere wurden bei Auftreten eines manifesten Diabetes (Blutglukosekonzentrationen >250 mg/dl in einem Tropfen Blut aus der Schwanzvene) beziehungsweise bei Versuche (20 Beobachtungswochen nach Immunisierung ohne Diabetesmanifestation) durch Inhalation von Kohlendioxid getötet.

2.1.8 Anzahl und Aufteilung der Versuchstiere

Insgesamt wurden 103 RIP-CD80+GP+ Mäuse in die Versuchsgruppe eingeschlossen. Davon waren 68 Tiere männlichen (66%) und 35 Tiere weiblichen Geschlechts (34%). Bei der Verteilung in die einzelnen Untersuchungsgruppen wurde das "litter-matching" Prinzip angewendet, bei dem die Nachkommen eines Wurfes in möglichst viele verschiedene Untersuchungsgruppen aufgeteilt werden mit der Intention, den genetischen Hintergrund der Gruppen ähnlich zu halten. Damit konnten mögliche Effekte direkt der jeweiligen Behandlungsmethode zugeschrieben und nicht als potentielle Ursache von Besonderheiten eines speziellen Wurfes und dessen Genetik gesehen werden.

Die Mäuse wurden auf 15 Untergruppen aufgeteilt. Die Gruppen des Pilotprojekts zur Etablierung neuer Applikationsformen der Peptide bestanden aus je 2-6 Mäusen (s. Tab. 2.1). Bei den Zellimmunisierungen wurde bis auf die Gruppe des Modellantigens GP 33-41 (hier wurden 10 Mäuse verwendet) eine durch vorhergängige Poweranalyse als statistisch relevante Versuchsgruppengröße von 12 Mäusen pro Peptid gewählt.

Zur Gewinnung der BM-DC aus dem Knochenmark für die Zellimmunisierungen wurden in der Pilotstudie zur Etablierung der Isolation und Kultivierung der Zellen (s. Kap. 2.3.2, BM-DC aus C57BL/6-RIP-GP+ Mäusen) 2 RIP-GP+ Weibchen als Spendertiere verwendet. Die Kohorte zur endgültigen Zellimmunisierungsreihe bestand aus insgesamt 6 B6.129S7-Rag1 tm1Mom/J-Weibchen als Knochenmarksdonoren.

Tabelle 2.1: Übersicht zur Aufteilung der Mäuse in die verschiedenen Untersuchungsgruppen ohne Berücksichtigung einer spezifischen Klassierung bezüglich Geschlecht oder Alter

Gruppe	Peptid	Immunisierung	Konzentration	Appl.	# Mäuse
1	GP 33-41	Peptid in PBS	50µg	s.c.	3
2	GP 33-41	Peptid in PBS	100µg	s.c.	3
3	GP 33-41	Peptid in PBS	150µg	s.c.	3
4	GP 33-41	Peptid in Alum	50µg	s.c.	3
5	GP 33-41	Peptid in Alum	100µg	s.c.	6
6	GP 33-41	Peptid in Alum	150µg	s.c.	6
7	GP 33-41	Peptid in Alum	50µg	i.p.	3
8	GP 33-41	Peptid in Alum	100µg	i.p.	4
9	GP 33-41	Peptid in Alum	150µg	i.p.	2
10	GP 33-41	Peptid mit BM-DC	0.1µg	i.p.	10
11	GP 276-286	Peptid mit BM-DC	10µg	i.p.	12
12	NP 396-404	Peptid mit BM-DC	10µg	i.p.	12
13	FNL 9	Peptid mit BM-DC	10µg	i.p.	12
14	mIGRP 225-233	Peptid mit BM-DC	10µg	i.p.	12
15	IGRP 241-249	Peptid mit BM-DC	10µg	i.p.	12
					Σ = 103

2.1.9 Überwachung und Kontrolle der Versuchstiere

Urin- und Blutglukosemessungen

Vor Injektion der Peptid- oder BM-DC/Peptidlösung wurden die jeweiligen Versuchstiere auf Glukoseausscheidung im Urin kontrolliert, da nur nicht diabetische Tiere in die Versuchsreihe eingeschlossen werden durften. Da bei dem verwendeten Mausmodell Diabetes nicht spontan, sondern erst nach spezifischer Induktion auftreten sollte, wurde bis auf 2 Tiere (diese zeigten spontan erhöhte Glukosewerte in Urin und Blut und wurden konsekutiv nach Protokoll durch Inhalation von Kohlendioxid getötet) bei allen anderen Versuchstieren ein Glukose-negativer Urintest nachgewiesen.

Beginnend mit der jeweiligen Behandlung wurden alle Versuchstiere folglich zweimal pro Woche mit Urinmessstreifen (Diastix; Bayer HealthCare) auf das Vorliegen einer Glukoseausscheidung im Urin kontrolliert. Nach zweimal hintereinander gemessener positiver Glukoseausscheidung im Urin wurde das Vorliegen einer manifesten diabetischen Stoffwechsellage durch die Messung von Blutglukosekonzentrationen >250 mg/dl in einem Tropfen Blut mittels Blutzuckermessgerät bestätigt (Contour; Bayer HealthCare). Der Blutstropfen wurde aus der mit einer sterilen Lanzette angeritzten Schwanzvene gewonnen. Bei verifizierter diabetischer Stoffwechsellage erfolgte im Anschluss die Tötung der Mäuse mittels Kohlendioxid-Gasinhalaion.

Statistischer Hintergrund zur Versuchstiergruppengröße und Auswertung der Versuchsergebnisse

Mit der Annahme einer Standardabweichung von 20% war bei einer Versuchstierzahl von 12 pro Gruppe mit einer Power von 80% die Ablehnung der Nullhypothese in Bezug auf die alternative Hypothese mit einem 0.05 type I error möglich.

Für die statistische Auswertung wurde das Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Unterschiede wurden bei einem p-Wert <0.05 als signifikant eingestuft.

2.2 Verwendete Peptide/CD8+ T-Zellepitope

2.2.1 Allgemein

In der Literatur werden CD8+ T-Zellepitope (= Peptide aus 8 bis 10 Aminosäuren) beschrieben, denen aufgrund verschiedenster T-Zellcharakterisierungsmethoden eine relevante Rolle in der Diabetes-assoziierten Autoimmunität zugesprochen wird (DiLorenzo 2007). Von diesen Peptiden wurden drei ausgewählt: FNL 9, IGRP 241-249 und mIGRP 225-233. Bezüglich der tatsächlichen Diabetogenität wird FNL 9 bis dato ein Evidenzlevel A (Evidenz, dass das Epitop von einem ganzen Protein präsentiert wird und die T-Zellantwort spontan erfolgt) sowie IGRP 241-249 und mIGRP 225-233 ein Evidenzlevel B (keine Evidenz, dass das Epitop von einem ganzen Protein präsentiert wird, jedoch spontane T-Zellantwort) (DiLorenzo 2007) zugesprochen. Als Kontrollpeptide dienten das dominante LCMV-GP 33-41, das subdominante LCMV-GP 276-86 (beides zytotoxische Epitope aus dem Positivautoantigen) und das LCMV-NP 396-404 (ein Peptid aus dem LCMV-Nukleoprotein, welches im verwendeten Mausmodell nicht präsent ist und somit als Negativkontrolle verwendet wurde). Beauftragt wurde die Firma Sigma, Genosys, die o.g. Peptide zu synthetisieren.

Die unten aufgeführten Tabellen geben Auskunft über die detaillierten Eigenschaften der einzelnen Peptide. Des Weiteren sind die Protokolle angefügt, die Informationen dazu geben, wie die in lyophilisierter Form vorliegenden Peptide jeweils in Lösung zu bringen waren. Je nach chemischen Eigenschaften wurde hierzu DMSO, NaOH, PBS (1x) und Aqua ad iniectabilia verwendet mit anschließender steriler Filtration (0.2 µM) der jeweiligen Peptidlösung. Die Konzentration der gelösten Peptide in der Stocklösung betrug 1mg/ml. Die Proben wurden in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert. Die Peptide wurden in Folge für die Zellimmunisierungen, die Peptidimmunisierungen sowie für die Analysen des Peptidbindungsverhaltens an die MHC Klasse 1 H-2Db der humanen lymphoblastischen "T2"-Zelllinie mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCalibur System, BD Biosciences) verwendet.

2.2.2 Eigenschaften der Peptide und Anleitung zur Herstellung der Peptidlösungen

In den folgenden Tabellen sind die Eigenschaften der Peptide sowie die Anleitung zu deren Herstellung aufgeführt:

Tabelle 2.2: Peptid: LCMV-GP 33-41

Peptid	LCMV-GP 33-41
Aminosäuren	9
Sequenz	KAVYNFATM
Antigen	LCMV-glycoprotein (Modellantigen)
Spezifität	/
Restriktion	MHC Klasse 1 H-2D ^b
SYFPEITHI Score "Db"	29
SYFPEITHI Score "Kb"	0
Referenzen	(DiLorenzo 2007; Ohashi 1991; Harlan 1994)
Molecular Weight	1096.2
Mass Spectrum	1096.86
Purity	90.07%
Hydrophobicity	(pH 2.0) 15.89 / (pH 6.8) 21
Acidic	0%
Basic	0%
Neutral	44.44%
Hydrophobic	33.33%
Peptid lösen	
Peptid (LCMV-GP 33-41)	0.004g
DMSO	+ 200µl
H ₂ O (aqua ad iniectabilia)	+ 3800µl
klare Lösung	= 4000µl [1mg/ml]

Tabelle 2.3: Peptid: LCMV-GP 276-286

Peptid	LCMV-GP 276-286
Aminosäuren	11
Sequenz	SGVENPPGGYCL
Antigen	LCMV-glycoprotein (Modellantigen)
Spezifität	/
Restriktion	MHC Klasse 1 H-2D ^b
SYFPEITHI Score "Db"	20 (10mer)
SYFPEITHI Score "Kb"	12 (8mer)
Referenzen	(DiLorenzo 2007; Pechhold 2007; Pechhold 2003)
Molecular Weight	1096.2
Mass Spectrum	1096.86
Purity	90.07%
Hydrophobicity	(pH 2.0) 15.89 / (pH 6.8) 21
Acidic	0%
Basic	0%
Neutral	44.44%
Hydrophobic	33.33%
Peptid lösen	
Peptid (LCMV-GP 276-286)	0.0065g
DMSO	+ 325µl
H ₂ O (aqua ad iniectabilia)	+ 6175µl
klare Lösung	= 6500µl [1mg/ml]

Tabelle 2.4: Peptid: LCMV-NP 396-404

Peptid	LCMV-NP 396-404
Aminosäuren	9
Sequenz	FQPQNGQFI
Antigen	LCMV-nucleoprotein
Spezifität	/
Restriktion	MHC Klasse 1 H-2D ^b
SYFPEITHI Score "Db"	29
SYFPEITHI Score "Kb"	0
Referenzen	(Pechhold 2007; Pechhold 2003)
Molecular Weight	1077.2
Mass Spectrum	1078.42
Purity	98.35%
Hydrophobicity	(pH 2.0) 15.89 / (pH 6.8) 21
Acidic	0%
Basic	0%
Neutral	44.44%
Hydrophobic	33.33%
Peptid lösen	
Peptid (LCMV-NP 396-404)	0.0044g
DMSO	+ 220µl
H ₂ O (aqua ad iniectabilia)	+ 4180µl
klare Lösung	= 4400µl [1mg/ml]

Tabelle 2.5: Peptid: FNL 9

Peptid	FNL 9
Aminosäuren	9
Sequenz	FQDENYLYL
Antigen	dystrophia myotonica kinase DMK
Spezifität	/
Restriktion	MHC Klasse 1 H-2D ^b
SYFPEITHI Score "Db"	27
SYFPEITHI Score "Kb"	0
Referenzen	(DiLorenzo 2007; Lieberman 2004)
Molecular Weight	1203.31
Mass Spectrum	1204.48
Purity	96,67%
Hydrophobicity	(pH 2.0) 35.67 / (pH 6.8) 33.22
Acidic	22.22%
Basic	0%
Neutral	11.11%
Hydrophobic	55.56%
Peptid lösen	
Peptid (FNL 9/DMK 138-46)	0.0044g
0.2 N NaOH	+ 440µl
PBS	+ 3960µl
klare Lösung	= 4400µl [1mg/ml]

Tabelle 2.6: Peptid: IGRP 241-249

Peptid	IGRP 241-249
Aminosäuren	9
Sequenz	KWCANPDWI
Antigen	Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein
Spezifität	mus=hum Sequenz
Restriktion	MHC Klasse 1 H-2D ^b
SYFPEITHI Score "Db"	23
SYFPEITHI Score "Kb"	0
Referenzen	(DiLorenzo 2007; Han 2005a; Han 2005b)
Molecular Weight	1131.32
Mass Spectrum	1131.89
Purity	85.22%
Hydrophobicity	(pH 2.0) 25 / (pH 6.8) 25.67
Acidic	11.11%
Basic	11.11%
Neutral	0%
Hydrophobic	55.56%
Peptid lösen	
Peptid (IGRP 241-49)	0.0046g
PBS	+ 4600µl
klare Lösung	= 4600µl [1mg/ml]

Tabelle 2.7: Peptid: mIGRP 225-233

Peptid	mIGRP 225-233
Aminosäuren	9
Sequenz	LRLFGIDLL
Antigen	Murine Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein
Spezifität	mus IGRP spezifisch
Restriktion	MHC Klasse 1 H-2D ^b
SYFPEITHI Score "Db"	15
SYFPEITHI Score "Kb"	0
Referenzen	(DiLorenzo 2007; Han 2005a; Han 2005b)
Molecular Weight	1060.33
Mass Spectrum	1060.43
Purity	84.64%
Hydrophobicity	(pH 2.0) 60.89 / (pH 6.8) 58.56
Acidic	11.11%
Basic	11.11%
Neutral	11.11%
Hydrophobic	66.67%
Peptid lösen	
Peptid (mIGRP 225-233)	0.0066g
DMSO	+ 660µl
H ₂ O (aqua ad iniectabilia)	+ 5940µl
klare Lösung	= 6600µl [1mg/ml]

2.2.3 SYFPEITHI

Bei SYFPEITHI handelt es sich um eine Online-Datenbank (www.syfpeithi.com) zur Vereinfachung der wissenschaftlichen Suche nach Informationen zu bestimmten Peptiden und der Vorhersage von T-Zellepitopen. Mittels des SYFPEITHI Scores lässt sich die Bindungsstärke zwischen einem gegebenen Peptid bzw. Epitop und einem bestimmten HLA- Molekül berechnen. Jeder Aminosäure innerhalb des Peptids wird hierzu ein Punktwert zwischen 1 und 15 gegeben, abhängig davon, ob die jeweilige Aminosäure an der gegebenen Position eine schwache Bindung mit dem HLA-Molekül eingeht (minimaler Punktwert: 1) oder eine sehr starke Verankerung (maximaler Punktwert: 15) hat (Rammensee 1999). Wenn sich eine Aminosäure an einer bestimmten Position nachteilig für die Bindungsstärke zwischen Peptid und HLA- Molekül auswirkt, werden auch negative Punktwerte verteilt (minimal -1 bis maximal -3 Punkte). Die Summe der Einzelwerte für jede Aminosäure ergibt die Bindungsstärke. Die Zuteilung der jeweiligen Werte basiert auf der Frequenz der spezifischen Aminosäure in natürlichen Liganden, T-Zellepitopen oder bindungsfähigen Peptiden.

2.3 Verifikation von diabetogenen CD8+ T-Zellepitopen

2.3.1 Zellimmunsierung

Allgemein

Intraperitoneale Injektionen mit aus Knochenmark von Spendermäusen isolierten und in der Zellkultur ausgereiften dendritischen Zellen (BM-DC), die mit Diabetes-relevanten Peptiden beladen sind, führen im RIP-CD80+GP+ Mausmodell zur effizienten β -Zellzerstörung und zur Diabetesmanifestation. Eigene und Ergebnisse von Kooperationspartnern beweisen, dass diese Methode im RIP-CD80+GP+ Mausmodell anwendbar ist, um *in vivo* die Diabetesrelevanz von CD8+ T-Zellepitopen (= Peptide aus 8 bis 10 Aminosäuren) zu prüfen. Dabei ist aus der Korrelation zwischen der Peptidkonzentration, die für die Beladung der BM-DC benutzt wird, und dem Zeitraum zur Diabetesmanifestation eine prädiktive Aussage über die Diabetesrelevanz der verwendeten Peptide möglich (Pechhold 2007). Folglich ist diese Methode im RIPCD80+GP+ Mausmodell

Tabelle 2.8: Versuchsaufbau der Zellimmunisierungen

Peptid	Konzentration Peptid	Dendritische Zellen	Appl.	# Mäuse
GP 33-41	0.1µM	200 000/300µl	i.p.	10
GP 276-286	10µM	200 000/300µl	i.p.	12
NP 396-404	10µM	200 000/300µl	i.p.	12
FNL 9	10µM	200 000/300µl	i.p.	12
mIGRP 225-233	10µM	200 000/300µl	i.p.	12
IGRP 241-249	10µM	200 000/300µl	i.p.	12

anwendbar, um die Diabetesrelevanz von CD8+ T-Zellepitopen (= Peptide aus 8 bis 10 Aminosäuren) *in vivo* zu prüfen.

Um die Transfermethode von reifen, Peptid-beladenen dendritischen Zellen (Peptid/BM-DC) zur Diabetesinduktion zu etablieren, wurden die drei Kontrollpeptide verwendet (s. Kapitel 2.2): das dominante LCMV-GP 33-41, das subdominante LCMV-GP 276-86 (Positivkontrolle) und das LCMV-NP 396-404 (Negativkontrolle). Ausserdem wurden die drei ausgewählten, in der Literatur als diabetesrelevante CD8+ T-Zellepitope beschriebenen Peptide verwendet: FNL 9, IGRP 241-249 und mIGRP 225-233, (s. Kapitel 2.2, Tab. 2.8 und 2.9). Alle Peptide wurden mit den BM-DC inkubiert und bezüglich ihrer Potenz zur Diabetesinduktion analysiert.

2.3.2 Reife dendritische Zellen aus dem Knochenmark

Für die Zellimmunisierungen wurden reife dendritische Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen verwendet. Dazu mussten die Zellen zunächst aus dem Knochenmark isoliert und anschließend kultiviert werden. Als Spendertiere dienten C57BL/6-RIP-GP+ Mäuse und B6.129S7-Rag1 tm1Mom/J Mäuse.

BM-DC aus C57BL/6-RIP-GP+ Mäusen

Für den Pilotversuch zur Etablierung der Isolation aus dem Knochenmark und Kultivierung der BM-DC dienten 2 weibliche 10 Wochen alte RIP-GP+ Mäuse. Die lichtmi-

Tabelle 2.9: Charakterisierung der einzelnen Peptide

Peptid	Aminosäurenlänge	Sequenz	Antigen		Restriktion	SYFP. Score Db	SYFP. Score Kb
GP 33-41	9	KAVYN FATM	LCMV -glycoprotein (model antigen)	/	Db	29	0
GP 276-286	11	SGVENP GGYCL	LCMV -glycoprotein (model antigen)	/	Db	20 (10mer)	12 (8mer)
NP 396-404	9	FQPQN GQFI	LCMV- nucleoprotein	/	Db	29	0
FNL 9	9	FQDEN YLYL	dystrophia myotonica kinase DMK	/	Db	27	0
IGRP 241-49	9	KWCAN PDWI	Islet-specific glucose-6 -phosphatase catalytic subunit -related protein	mus=hum sequence	Db	23	0
mIGRP 225-233	9	LRLF GIDLL	Islet-specific glucose-6 -phosphatase catalytic subunit -related protein	mus IGRP specific	Db	15	0

kroskopische Analyse zeigte, dass die Gewinnung und Anzucht der dendritischen Zellen erfolgreich waren. Allerdings waren neben den dendritischen Zellen gleichfalls andere Zelltypen (z. B. B- oder T-Zellen) nachweisbar.

BM-DC aus B6.129S7-Rag1 tm1Mom/J Mäusen

Für die Hauptversuche wurden daher B6.129S7-Rag1 tm1Mom/J Mäuse als Spender-tiere verwendet, die durch eine homozygote Mutation im Rag1-Gen keine reifen T- oder B-Zellen bilden können. Damit konnte die Isolation der dendritischen Zellen deutlich effizienter und ohne Verunreinigung von T- oder B-Zellen erfolgen. Um zwei unabhängige Experimente auswerten zu können, wurden die BM-DC zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in identisch aufgebauten Experimenten isoliert. Im ersten Versuchsteil wurden die dendritischen Zellen aus vier B6.129S7-Rag1tm1Mom/J Mäusen und im zweiten Teil aus zwei B6.129S7-Rag1tm1Mom/J weiblichen Spendermäusen isoliert.

2.3.3 Isolation und Kultivierung der BM-DC

Zur Gewinnung der BM-DC aus dem Knochenmark wurden Humerus, Femur, Tibia verwendet. Nach Euthanasierung der Mäuse erfolgte die Präparation der Knochen unter der sterilen Werkbank. Wichtig war dabei die sorgfältige Entfernung von anhaftenden Geweberesten, um die reinen Knochen zu erhalten. Nach Desinfektion der Knochen in einem 70% Ethanolbad und anschließender Spülung in 10%RPMI, wurden die Enden des jeweiligen Knochens gekappt, um den Markkanal freizulegen. Durch Spülung des Markkanals mit 10%RPMI (10ml Spritze, 26G Kanüle) konnte das Knochenmark extrahiert werden. Im Anschluss wurde das Gemisch gründlich resuspendiert und durch Filterung über ein Nylon-Mesh (BD Bioscience, BD Falcon, Cell Strainer, 40µm Nylon, REF 35 23 40) aufgereinigt. Nach Auszählung der Zellen erfolgte für 6 Tage die *in vitro* Kultivierung der Zellen in der gewünschten Zellkonzentration von $0.1 \times 10^6/\text{cm}^2$. Dazu wurden die Zellen in 145cm²-wells mit für BM-DC optimiertem Medium (RPMI inkl. 10% FCS, GM-CSF (10ng/ml), IL-4 (10ng/ml)) überführt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Haereus Instruments, Typ BB 16 CU) in Kultur genommen. Zur Ausreifung der Zellen wurden während der letzten 16 Stunden vor der Peptidbeladung 200ng/ml LPS-E.coli (Sigma Aldrich) supplementiert.

2.3.4 Peptidinkubation und Injektion der BM-DC

Um Varianzen der individuellen BM-DC-Qualitäten zu minimieren und sichere Ergebnisse zu erhalten, wurden in beiden Experimenten die jeweils kultivierten reifen BM-DC vor Beladung mit den Peptiden vereinigt und gleichmäßige Portionen aus dieser Zellsuspension mit den jeweiligen Peptiden LCMV-NP 396-404, LCMV-GP 33-41, LCMV-GP 276-286, FNL 9, mIGRP 225-233 oder IGRP 241-249 beladen. Dazu wurde der Inhalt der einzelnen Zellkulturschalen resuspendiert, in ein großes Probenröhrchen zusammengebracht und bei 1200rpm, 5min, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Zellpellet mit BM-DC Medium resuspendiert und die Zellsuspension anschließend auf 6 10cm²-wells aufgeteilt. Die Peptide LCMV-NP 396-404, LCMV-GP 276-286, FNL 9, mIGRP 225-233 und IGRP 241-249 wurden in einer Verdünnung von 1:100 in die jeweilige Zellkulturschale zugegeben (Konzentration gegeben: 1mg/ml (1M), gewünscht: 10µM). Die Positivkontrolle GP 33-41 des dominanten Modellantigens wurde in einer Konzentration von 1: 10 000 in die Zellsuspension zugefügt (Konzentration gegeben: 1mg/ml (1M), gewünscht: 0.1µM). Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Peptid für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank. Im nächsten Schritt wurde die Lösung abermals vorsichtig resuspendiert, bei 1200rpm / 5min / 4°C zentrifugiert und das Zellpellet nach Abgießen des Überstandes in 12ml PBS (Magnesium und Calcium enthaltend) gelöst. Zum Schluss wurden die Zellen in der Suspension ausgezählt und die entsprechende Menge PBS zugefügt, um die gewünschte Konzentration der Injektionslösung zu erhalten: Pro Maus wurden einmalig 200 000 reife, murine, peptidbeladene BM-DC gelöst in 300µl PBS streng intraperitoneal injiziert. Vor Injektion der peptidbeladenen BM-DC wurden die jeweiligen Mäuse bezüglich des Vorliegens einer möglichen spontan aufgetretenen diabetischen Stoffwechsellaage per Uringlukosetest geprüft. Bei Nachweis einer Glukosurie wurden die Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen (s. Kapitel 2.1.7).

2.3.5 Alternative Applikationsverfahren: Peptidimmunisierungen

Obwohl die Diabetesinduktion mit der Methode der Zellimmunisierungen sehr zuverlässig funktionierte, waren die Gewinnung und Kultivierung der BM-DC sowie die Nachverfolgung der Mäuse bis zur Diabetesentstehung zeitaufwändig. Daher wurden

drei Studien durchgeführt, um zu prüfen, ob andere Applikationsmethoden der Peptide ebenfalls zur Diabetesentstehung führen und gegebenenfalls einen Zeitgewinn mit sich bringen. Außerdem sollte verglichen werden, ob bei Adressierung aller Immunzellen die gleichen Epitope wie bei der spezifischen Zellimmunisierung diabetogene Eigenschaften aufweisen. Für diese Versuche wurde ausschließlich das dominante LCMV-GP 33-41 benutzt, welches bereits in sehr geringer Konzentration ($0.1\mu\text{M}$) im Rahmen der Zellimmunisierungen effizient und zeitnah Diabetes in RIP-CD80+GP+ Mäusen auslöste (s. Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). Dazu wurde das Peptid im ersten Versuchsteil direkt in sterilen PBS-Puffer aufgenommen (Konzentration: 1mg/ml) und subkutan in verschiedenen Dosierungen ($50\mu\text{g}$, $100\mu\text{g}$, $150\mu\text{g}$ Peptid - also $50\mu\text{l}$, $100\mu\text{l}$, $150\mu\text{l}$ Peptid-PBS-Lösung) in die RIP-CD80+GP+ Mäuse injiziert. Im zweiten Versuchsteil erfolgte die Applikation des Peptids in Kombination mit einem Adjuvans (Imject Alum; Pierce, Rockford, USA), um die Immunantworten durch Lokalisierung des Antigens über eine längere Zeit und die Anlockung von geeigneten Immunzellen (T-, B- und Antigen-präsentierenden Zellen) zu steigern. Es wurde Imject Alum (Pierce, Rockford, USA) verwendet, da es als weniger aggressiv als Freund's Adjuvant gilt. Die Lösung aus Peptid und Imject Alum wurde einmal ebenfalls subkutan appliziert, in einem weiteren Versuchsteil wurde die intraperitoneale Verabreichung angewandt. Die Peptidlösung (Konzentration: 1mg/ml) und Imject Alum wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Mäuse mit der Peptid-Alum-Lösung wiederum in verschiedenen Dosierungen ($50\mu\text{g}$, $100\mu\text{g}$, $150\mu\text{g}$ Peptid - also $100\mu\text{l}$, $200\mu\text{l}$ und $300\mu\text{l}$ Peptid-Alum-Lösung) mittels subkutaner bzw. intraperitonealer Gabe immunisiert (s. Tab. 2.10).

Tabelle 2.10: Alternative Applikationsmethoden der Peptidimmunisierung mit GP 33-41

Gruppe	Peptid	Immunisierung	Konzentration	Appl.	# Mäuse
1	GP 33-41	Peptid in PBS	50µg	s.c.	3
1	GP 33-41	Peptid in PBS	100µg	s.c.	3
1	GP 33-41	Peptid in PBS	150µg	s.c.	3
2	GP 33-41	Peptid in Alum	50µg	s.c.	3
2	GP 33-41	Peptid in Alum	100µg	s.c.	6
2	GP 33-41	Peptid in Alum	150µg	s.c.	6
3	GP 33-41	Peptid in Alum	50µg	i.p.	3
3	GP 33-41	Peptid in Alum	100µg	i.p.	4
3	GP 33-41	Peptid in Alum	150µg	i.p.	2

2.4 Charakterisierung der diabetogenen CD8 T-Zellepitope

2.4.1 Allgemeines

Analyse des Peptidbindungsverhaltens an murine MHC-Klasse 1 H-2D(b) Moleküle

Die Diabetesinduktion im RIP-CD80+GP+ Modell ist nicht nur von der generellen Diabetesrelevanz der verwendeten Peptide, sondern auch von deren Bindungsaffinität an die MHC-Klasse 1 Moleküle abhängig (Pechhold 2007). Daher sollte mit Hilfe einer Zelllinie (humane Lymphoblasten-Zelllinie "T2"), deren Zellen transgen murine MHC-Klasse 1 H-2Db Moleküle synthetisieren, das Bindungsverhalten der jeweils verwendeten Peptide an die MHC-Klasse 1 Moleküle untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Peptide über Nacht mit der u.g. Zelllinie inkubiert. Folgend wurden mittels Fluoreszenzfärbungen der MHC-Klasse 1 Moleküle und anschließender Durchflusszytometrie die Peptidkonzentrationen berechnet, die notwendig waren, um die MHC-Klasse 1 Moleküle um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluor-

reszenz zu stabilisieren. Es sollten die Bindungscharakteristika der jeweiligen Peptide analysiert und zusätzlich untersucht werden, ob die jeweilige Bindungsaffinität eine prädiktive Aussagekraft bezogen auf die Diabetesrelevanz der Peptide im *in vivo* Modell hatte. Darüber hinaus konnten die Bindungseigenschaften der individuellen Peptide in Relation zueinander verglichen werden.

2.4.2 Verwendete Zelllinie

Humane Lymphoblasten-Zelllinie "T2" (174xCEM.T2)

Bei den Zellen der humanen Lymphoblasten-Zelllinie "T2" (ATCC CRL-1992, Cell Biology, LGC Standards) handelt es sich um eine Variante der T1-Zelllinie (ATCC CRL-1991). Es erfolgt keine Expressierung des HLA DR Moleküls. HLA B5 wird zwar synthetisiert, jedoch ebenfalls nicht exprimiert. Für das MHC-Klasse 2 Antigen sind die Zellen negativ. Die Zellen synthetisieren transgen murine MHC-Klasse 1 H-2Db Moleküle. Da die Diabetesinduktion im RIP-CD80+GP+ Mausmodell neben der generellen Diabetesrelevanz der ausgewählten Peptide auch von deren Bindungsaffinität zu den MHC-Klasse 1 Molekülen abhängt (Pechhold 2007), wurde diese Zelllinie ausgewählt, um das Bindungsverhalten der jeweiligen Peptide an die MHC-Klasse 1 H-2Db Moleküle mithilfe von Fluoreszenzfärbungen und anschließender Durchflusszytometrie zu untersuchen.

2.4.3 Verarbeitung der Zellen

Lagerung, Auftauen und Kultivierung der Zellen

Der Bestand der verwendeten Zellen wurde bis zum Gebrauch in Cryovials bei -196°C im Stickstofftank (KCI der Kinderklinik München Schwabing) gelagert. Bei Bedarf wurde die benötigte Menge an Proben entnommen, zügig im Wasserbad (ca. 25°C) aufgetaut und die Zellen anschließend resuspendiert. Pro 1ml Zellsuspension wurden 7ml 10% RPMI Medium (500ml RPMI 1640, 50 ml FBS hitzeinaktiviert (30 min, 56°C), 10 ml PSG, 5 ml HEPES, 1M, in 0.85% NaCl, 5 ml NEAA Mixture 100x, 5ml Na (=Natrium) Pyruvat Solution, steril filtriert, $0,22\ \mu\text{m}/500\text{ml}$), tropfenweise hinzugegeben, die Suspension abzentrifugiert (1200rpm, 5min, 4°C) und der Überstand abgossen. Die-

ser Arbeitsschritt erfolgte jeweils zweimal. Zum Schluss wurden die Zellen in 4ml 10% RPMI aufgenommen (Konzentration: 3×10^5 Zellen/ml) und in 12-well-Platten bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurde alle 2 Tage das Medium (10% RPMI) erneuert und die Zellpopulation gesplittet, um die Konzentration bei etwa 3×10^5 Zellen/ml konstant zu halten.

Einfrieren/Erhalt eines Grundstockes der Zellen

Um den Grundbestand der Zellen aufrecht zu erhalten, wurde bei Bedarf ein Teil der nachgezüchteten Zellen wieder eingefroren. Dazu wurden Zellen aus 3 bis 4 12-well-Platten verwendet und zunächst abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C). Anschließend erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 3ml 10% RPMI. Es wurden 3ml 20% DMSO-Einfriermedium (10ml DMSO, 15ml FCS, 25ml 10% RPMI, steril filtriert, 0.22 µm/500ml) hinzugegeben, die Lösung vermischt und auf 6 Cryovials à 1ml verteilt. Um die Zellen möglichst schonend einzufrieren, wurden sie zunächst für 2 Stunden bei -20°C, dann für 1 Tag bei -80°C gelagert, um sie anschließend zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank (-196°C) zu überführen.

Pulsen der Zellen mit den Peptidlösungen

Die zu untersuchenden Peptide sind alle Db-restringiert. Vor dem Antikörper-Staining und folgender durchflusszytometrischer Untersuchung wurden Zellen der humanen Lymphoblasten-Zelllinie "T2" mit den jeweiligen Peptiden inkubiert. Es wurden insgesamt 7 verschiedene Ansätze in je 2 verschiedenen Konzentrationen der Peptide (30 und 75µM) erstellt. Untersucht wurden GP 276-286, mIGRP 225-233, IGRP 241-249, FNL 9, NP 396-404 gepoolte Zellen aus den 6 verschiedenen Ansätzen und Zellen ohne vorherige Peptidpulsung. Die T2-Zellen wurden über Nacht mit den jeweiligen Peptiden in den 2 verschiedenen Konzentrationen (30µM, 75µM) bzw. ohne Peptid inkubiert. Anschließend erfolgte die separate Resuspension der Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Um den Ansatz der gepoolten Zellen zu erstellen, wurde aus jedem der Ansätze je 100µl in ein Tube überführt und vermischt. Nach Pipettierschema (s. Abb. 2.1) wurden je 200µl der jeweiligen peptidgepulsten Zelllösungen auf eine 96-well-V Bodenplatte aufgebracht. Dann erfolgte eine Zentrifugation (1200rpm, 5min, 4°C) und das Abgießen des Überstandes. Anschließend wurden die Zellen mit je 200µl 1% BSA-

PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen.

2.4.4 Analytische Durchflusszytometrie

Grundlagen der Durchflusszytometrie

Mithilfe des Verfahrens der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) ist die simultane Messung physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen und Partikeln möglich. 1975 wurde das Verfahren, so wie es heute bekannt ist, von Crissman et al. entwickelt (Crissman 1975). Grundlage der FACS-Analyse ist eine (gefärbte) Einzelzellsuspension (oder andere lösliche Partikel). Die Zellen passieren einzeln einen fokussierten Laserstrahl, wobei das dabei erzeugte charakteristische Streu- und Fluoreszenzlicht separat detektiert wird. Mit dieser Methode lassen sich relativ große Zellzahlen in vergleichsweise kurzer Zeit analysieren (bis zu 20 000 Zellen/ Sekunde) (Shapiro2003). Eingesetzt wird das Messsystem zusammen mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die jeweils spezifisch für das zu quantifizierende Antigen gewählt werden müssen. Die Differenzierung der verschiedenen Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt über unterschiedliche Emissionsmaxima der Antikörper-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate. Damit ist prinzipiell eine simultane Analyse mehrerer extra- und intrazellulärer Stoffe in einer Messung möglich.

Grundaufbau des Durchflusszytometers

Für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das BD FACSCalibur-System (BD Biosciences) verwendet, welches sich aus einem Durchflusszytometer und einer BD FACStation Workstation zusammensetzt. Das System entspricht im Arbeitsprinzip und Grundaufbau gängigen Durchflusszytometern.

Optisches System

Das FACSCalibur-System hat einen 15mW Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm. Zur Analyse der strukturellen Zellmerkmale (z.B. Größe und Granularität) wird das Licht des Lasers in zwei Streulichtkanälen gemessen, dem Vorwärtsstreulicht-Kanal [engl. forward scatter (FSC)] und dem Seitwärtsstreulicht-Kanal [engl. side scatter (SSC)]. Neben den Streulichtkanälen hat das Durchflusszytometer zur Auswertung

des emittierten Lichtes 3 Fluoreszenzkanäle (FL 1-3). Das Vorwärtsstreulicht macht den größten Teil des einfallenden Lichtes aus, dieses wird durch das Partikel in dessen Vorwärtsrichtung gestreut. Der FSC-Wert ist ein Maß für die Partikel- bzw. Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht trifft im rechten Winkel zu seiner Einfallsrichtung auf und ist ein Maß für die Granularität (= Körnigkeit) der Zelle.

Durch Markierung von Zellen mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen können die Zellen anhand des spezifischen Emissionsspektrums in ihren Subpopulationen mittels der Durchflusszytometrie dargestellt und analysiert werden.

Software

Die durch die FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse wurden mithilfe der BD CellQuest Pro Software akquiriert und ausgewertet.

2.4.5 Verwendete Antikörper zum Zellstaining

2.4G2 Antikörper (= Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32, Mouse BD Fc Block™, BD Biosciences, [0.5µg/ml])

Der 2.4G2-Antikörper blockt *in vitro* und *in vivo* nicht-Antigen-spezifische Bindungen von Immunglobulinen an FcγIII- und FcγII-Rezeptoren, wahrscheinlich auch FcγI-Rezeptoren von Mäusen. CD16 und/oder CD32 werden auf natürlichen Killerzellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Kupffer-Zellen, Granulozyten, Mastzellen, B-Lymphozyten, unreifen Thymozyten und auf einigen aktivierten reifen T-Lymphozyten exprimiert.

7AAD Antikörper (= Cell Viability Solution, BD Biosciences, 1000µl)

7-Amino-Actinomycin D (=7AAD) wird anstelle von Propidium Iodid (=PI) verwendet, um die abgestorbenen Zellen in den Ansätzen zur FACS-Analyse sichtbar zu machen. Im Gegensatz zu PI kann 7AAD zusammen mit PE und FITC-gelabelten monoklonalen Antikörpern in einer 2-Farbenanalyse mit nur minimaler Überlappung im Farbspektrum verwendet werden.

Anti-Db-PE-Antikörper (= PE anti-mouse H-2Db, BD Biosciences, [0.5µg/ml])

Der Antikörper reagiert mit dem H-2Db MHC Klasse 1 Alloantigen, welches auf kernhaltigen Zellen von Mäusen des H-2Db Haplotypes exprimiert wird. H-2Db ist beteiligt an der Antigenpräsentation für T-Zellen mit der Expression von CD3 T-Zellrezeptoren und CD8 Proteinen.

Herstellung der verdünnten Antikörper-Lösungen

Um die gewünschte Antikörper-Konzentration von 5µg/ml zu erhalten, wurden die jeweiligen Antikörper-Stocklösungen [0.5mg/ml] mit BSA-PBS (ohne Calcium und Magnesium) 1:100 verdünnt.

2.4.6 Fluoreszenzfärbung der Zellen mit anti-Db-PE, 2.4G2 und 7AAD

Zunächst wurden alle Zellen als Vorfärbeschritt zum Block unspezifischer Fc-Bindungen mit dem 2.4G2 Antikörper (je 50µl der 1:100 Verdünnung) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der anti-Db-PE Antikörper nach Pipettierschema (s. Abb. 2.1) zu den Proben hinzugegeben, die Lösungen durch Auf- und Abpipettieren mit einer Mehrkanalpipette resuspendiert und für 25 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte eine Abzentrifugation (1200rpm, 5min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 200µl 1% BSA-PBS (ohne Calcium/Magnesium) resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Zuletzt wurde nach Pipettierschema (s. Abb. 2.1) in die entsprechenden wells je 20µl 7AAD-Lösung zum Anfärben bzw. zur Kenntlichmachung der abgestorbenen Zellen hinzugegeben und die Lösungen durch Pipettieren vermischt mit anschließender Inkubation für 10 Minuten.

2.4.7 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen mittels FACS-Calibur

In einer Studie von Pechhold (2007) konnte gezeigt werden, dass die Diabetogenität von spezifischen Peptiden unter anderem von deren Bindungsaffinität an MHC-Klasse 1 Moleküle abhängt. Um dieses Verhalten an den in dieser Arbeit verwendeten Pepti-

Peptid	30µM =30µl Peptidlösung/well						75µM =75µl Peptidlösung/well						
	nur PE		PE+7AAD				nur PE		PE+7AAD				
LCMV-gp 276-286	■		■		■		■		■		■		2.4 G2 Fc- Bloc k
mIGRP 225-233		■		■		■		■		■		■	
IGRP 241-249	■		■		■		■		■		■		
FNL 9		■		■		■		■		■		■	
LCMV-np 396-404	■		■		■		■		■		■		
	je 925µl Zellsuspension/well						je 970µl Zellsuspension/well						
kein Peptid		■		■		■							
gepoolte Zellen	ung efär bt		ung efär bt		nur 7A AD		nur 7A AD						
	je 1000µl Zellsuspension/well						je 1000µl Zellsuspension/well						

Abbildung 2.1: Pipettierschema: Antikörperstaining der peptidinkubierten humanen Lymphoblasten-Zelllinie "T2"

den zu überprüfen, wurde mittels der humanen Lymphoblasten-Zelllinie "T2", deren Zellen transgen murine MHC-Klasse 1 H-2Db Moleküle synthetisieren, das Bindungsverhalten der jeweiligen Epitope an die MHC-Klasse 1 Moleküle untersucht. Nach erfolgter Übernacht-Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Peptiden und anschließender Fluoreszenzantikörperfärbung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die durch die FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse wurden mithilfe der BD CellQuest Pro Software akquiriert und ausgewertet. Es wurde untersucht, welche Peptidkonzentrationen zum Pulsen der Zellen notwendig waren, um die MHC-Klasse 1 Moleküle um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluoreszenz zu stabilisieren. Es wurden die Bindungscharakteristika der einzelnen Peptide analysiert und ferner untersucht, ob die jeweilige Bindungsaffinität mit der *in vivo* gemessenen Diabetesrelevanz korreliert. Darüber hinaus erfolgte ein Vergleich der Bindungseigenschaften der individuellen Peptide in Relation zueinander. Aufgrund von zwei gleichartig durchgeführten Messungen am HMGU München zu zwei verschiedenen Zeitpunkten konnten die Ergebnisse auf ihre Wiederholbarkeit überprüft werden.

2.5 Genotypisierung der RIP-CD80+GP+ Mäuse

2.5.1 Allgemeines

Um das Vorhandensein des CD80-Transgens auf den pankreatischen β -Zellen und die damit assoziierte Suszeptibilität für Autoantigen-induzierbaren Diabetes bei den RIP-CD80+GP+ Mäusen zu verifizieren, wurde aus jedem Wurf der RIP-CD80+GP+ Versuchstiere die DNA je einer zufällig ausgewählten Maus diesbezüglich analysiert. Als Negativkontrolle für die Genotypisierung des CD80-Genes diente die zusätzlich isolierte DNA von 2 NOD-Mäusen, welche dieses Gen nicht trugen.

2.5.2 DNA-Isolation

Zur DNA-Analyse wurde den jeweiligen Mäusen ca. 0.5cm von ihrer Schwanzspitze abgeschnitten und in ein 2ml-Sarstedt-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 50 μ l Lysis Buffer (pH 8.0, 50mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1%SDS, H₂O) und 50 μ l Proteinase K (gelöst in H₂O, Konzentration 10mg/ml) pro Röhrchen wurden die

Röhrchen bei 55°C für mindestens 2 Stunden bei moderater Schüttelfrequenz im Thermomixer inkubiert. Um die Auflösung des Gewebes zu optimieren, wurden die Proben anschließend 5 Minuten lang bei Raumtemperatur im Vortexer durchgemischt. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 200µl gesättigte NaCl-Lösung pro Röhrchen und eine Wiederholung des Vortex-Vorgangs. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13 000rpm, 8 min, Raumtemperatur), um Detritus und Suspension voneinander zu trennen. Jeweils 750µl des Überstandes wurden abpipettiert und in ein neues Sarstedt-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 500µl Isopropanol (2-Propanol) zu jedem Röhrchen und vorsichtiges Wenden der Proben konnte die fadenartige, weißliche DNA ausgefällt werden. Nun wurden die Proben abermals zentrifugiert (13 000rpm, 2 min, Raumtemperatur), um die DNA als Pellet erhalten, den Überstand abgießen und die DNA durch 2 folgende Ethanolwaschschritte aufzureinigen zu können. Dazu wurden nach Abgießen des Überstandes 500µl 70% Ethanol in jedes Tube pipettiert (erster Ethanolwaschschritt) und das DNA-Pellet mithilfe des Vortexers resuspendiert. Für den zweiten Ethanolwaschschritt wurden die Proben wieder zentrifugiert (13 000 rpm, 2 min, Raumtemperatur) und die weiteren Schritte analog zum ersten Ethanolwaschschritt durchgeführt. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die Proben ca. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet. Die Pellets wurde anschließend in jeweils 100µl “molecular-grade-water” (DNase/RNase frei) pro Tube resuspendierte. In dieser Form waren die DNA-Proben bei 4°C unbegrenzt lagerbar.

2.5.3 Amplifikation der isolierten DNA mittels PCR

Um die DNA der 19 RIP-CD80+GP+ Mäuse zu amplifizieren und im nächsten Schritt mittels Gelelektrophorese die amplifizierte DNA aufzutrennen und das Vorhandensein des CD80-Genes nachzuweisen, wurden folgende Primer verwendet: mCD80 (sense): 5'- CAA ACA ACA GCC TTA CCT TCG G -3' und mCD80 (antisense): 5'- GCC TCC AAA ACC TAC ACA TCC T -3'. Das Produkt der Amplifikation war ca. 642 Basenpaare lang, es war keine Unterscheidung möglich ob des Vorliegens eines homo- oder heterozygoten Genotypes für mCD80. Als PCR-Positivkontrolle diente der Kontrollprimer “MEN Gen” (MEN (sense): 5'- GCC TCA CCT ACT TTC CCG TGG -3' und MEN (antisense): 5'- TCC ATA TGA CAT CGG AGA CC -3'). Da dieses Gen bei jeder Maus vorliegt, ergibt folglich eine erfolgreiche PCR immer ein Produkt (ca. 159

Basenpaare). Die Primer wurden durch die Firma Eurofins MWG/Operon synthetisiert und in gelöster Form (50pmol/ μ l) geliefert. Da das GP-Gen im Rahmen dieser Arbeit lediglich als Positivkontrolle diente, wurde auf dessen genetischen Nachweis verzichtet. Zunächst erfolgte die Herstellung eines PCR-Mastermixes (30-facher Ansatz, 585 μ l). Dazu wurden 441.6 μ l H₂O, 60 μ l 10x Puffer (15mM MgCl₂), 15 μ l von jedem dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2mM), also insgesamt 60 μ l, sowie 6 μ l Primer mCD80 (sense) (10pmol/ μ l), 6 μ l Primer mCD80 (antisense) (10pmol/ μ l) und 4,5 μ l Primer MEN (sense) (10pmol/ μ l), 4,5 μ l Primer MEN (antisense) (10pmol/ μ l) auf Eis pipettiert. Zum Schluss wurden 2.4 μ l der besonders wärmeempfindlichen Taq Polymerase (5units/ μ l) hinzugegeben und alles durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die intermittierende Aufbewahrung des Mastermixes erfolgte bei -20°C. Pro PCR-Probe wurde je 19.5 μ l PCR-Mastermix mit 0.5 μ l genomischer DNA vermischt. Daraufhin wurden die 20 μ l Gesamtvolumen in PCR-Probenröhrchen (0.2ml ultradünn, farblos) überführt und der PCR-Zyklus (3' 94° (30''94° / 30''56° / 30''72°) 38x 5'72°) des Thermocyclers (PTC-100 mit Hot Bonnet) gestartet.

2.5.4 Analyse und Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente wurden die PCR-Produkte auf ein 1.5% Agarosegel aufgebracht. Es wurde eine Gelkammer (Agagel Mini, Biometra, Code-No.: 020-00) mit einer Geldicke von 0.5cm verwendet. Das benötigte Volumen für ein Elektrophoresegel betrug 37ml sowie 260ml für den TBE-Laufpuffer. Zur Herstellung eines 1.5% Agarosegels von 37ml Volumen und 0.5cm Dicke wurden 0.55g Agarose mit 37ml 0,5x TBE-Puffer in ein Becherglas gegeben und das Agarose-Wasser-Gemisch auf einer Heizplatte so lange erhitzt und mittels Rührfisch vermischt, bis die Agarose komplett gelöst war. Anschließend kühlte die Lösung auf ca. 60°C ab, dann wurden 1.85 μ l Ethidiumbromid in die Flüssigkeit gegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Somit wurde eine Konzentration von 0.5 μ g Ethidiumbromid pro ml Gel erreicht (ursprüngliche Konzentration: 10mg EtBr/ml). Das Gel wurde in die Gelkammer gegossen und härtete innerhalb von 20min aus. Bevor die Proben mit der amplifizierten DNA auf das Gel aufgebracht werden konnten, erfolgte die Zuga-

Tabelle 2.11: Pipettierschema: Gelelektrophorese 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ladder	10	14	22	30	40	45	50	55	60	NOD	40	Ladder

Anmerkung: Bei den Ziffern in der zweiten Zeile handelt es sich um die Identifikationsnummern der jeweiligen Versuchstiere. In Slot 6: Tasche ausgelaufen, daher nochmals in Tasche 12 pipettiert, um Ergebnis zu sichern.

Tabelle 2.12: Pipettierschema: Gelelektrophorese 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ladder	102	106	112	121	127	133	135	142	144	65	NOD	Ladder

Anmerkung: Bei den Ziffern in der zweiten Zeile handelt es sich um die Identifikationsnummern der jeweiligen Versuchstiere.

be eines Loading Buffers (TrackIt Cyan/Yellow Loading Buffer, Invitrogen). Pro 20µl PCR-Probe wurde 3.3µl Loading Buffer zugefügt und die Flüssigkeit vermischt. Bei Verwendung eines Gels mit 12 Taschen wurden 9.5µl pro Tasche hinzugegeben. Die DNA-Referenz-Leiter (TrackIt 50bp DNA Ladder, Invitrogen) wurde mit 5µl pro Tasche aufgebracht (s. Tab. 2.11 und 2.12). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 125V und 45min Laufdauer. Bei erfolgreicher PCR konnte bei allen Proben (bis auf die Negativkontrolle = DNase/RNase freies Wasser) die Positivkontrolle (MEN-Gen) bei 159 Basenpaaren nachgewiesen werden. Bei vorhandenem CD80-Gen (sowohl homo- als auch heterozygot) war zusätzlich eine Bande bei 642 Basenpaaren sichtbar. War die Probe CD80-negativ, so war nur die Bande des MEN-Gens erkennbar (Negativkontrolle des CD80 Genes: DNA von 2 NOD-Mäusen, die dieses Gen nicht tragen). Zuletzt wurden die Ergebnisse der Gelelektrophorese mittels Imager visualisiert. Als Beweisdokumentation wurde eine entsprechende Kopie des Gels als Bildabzug erstellt.

2.6 Übersicht: Häufig verwendete Medien, Reagenzien und Geräte

2.6.1 Häufig verwendete Medien

Zellkultur

- Kulturmedium 10% RPMI:

500ml RPMI 1640

+ 50ml FBS Gold, hitzeinaktiviert (30 min, 56°C)

+ 10ml PSG

+ 5ml HEPES, 1M, in 0.85% NaCl

+ 5ml NEAA Mixture 100x

+ 5ml Na (=Sodium) Pyruvat, Solution

+ 500µl 2-Mercaptoethanol

Anschliessend: Steril filtrieren (0.22µm/500ml), Lagerung: bei 6°C.

- PSG:

500ml Penicillin/Streptomycin

+ 500ml L-Glutamine

Anschliessend: Aufteilung in 50ml Aliquots, Lagerung bei -20°C.

- Einfriermedium:

10ml DMSO

+ 15ml FBS

+ 25ml 10% RPMI

Anschliessend: Steril filtrieren (0.22µm/500ml), Lagerung bei 6°C.

- BM-DC-Medium:

50ml 10% RPMI-Medium

+ 20µl IL-4 (1:2500 IL-4 [25µg/ml])

+ 20µl GM-CSF (1:2500 GM-CSF [25µg/ml])

Anschliessend: Finale Konzentration von IL-4, GM-CSF: [10ng/ml].

DNA-Isolation

- Lysis Buffer (pH 8.0)

Lysis Buffer (pH 8.0)	für 500ml Menge
50mM Tris-HCl	1M Tris-HCl pH 8.0: 25ml
100mM EDTA	0.5M EDTA pH 8.0: 100ml
100mM NaCl	2.922g
1% SDS	10% SDS: 50ml
H ₂ O	325ml

Gelelektrophorese

- EDTA-Stammlösung (0.5M; pH 8.0)

0.5M EDTA (pH 8.0)	für 500ml Menge
EDTA disodium salt, dihydrate (FW 372.2)	93.05g
destilliertes H ₂ O	insg. auf 500ml auffüllen
NaOH	um pH auf 8.0 einzustellen (titrieren)

- 5x TBE-Puffer

5x TBE-Puffer	für 1L-Grundlösung
Tris-Base (mw 121.14)	54g
Borsäure (mw 61.83)	27.5g
EDTA 0.5M (pH 8.0)	20ml
deionisiertes oder destilliertes H ₂ O	auf 1L auffüllen

- Agarosegel 1.5%

Agarosegel 1.5%	250ml	70ml (1cm Gel)	37ml (0.5cm Gel)
Agarose	3.75g	1.05g	0.55g
0.5x TBE-Puffer	250ml	70ml	37ml

Anschliessend: Für ein 37ml-Agarosegellösung (37ml) werden 1.85µl EtBr zugegeben [0.5µg/ml Gel].

PCR

- PCR-Mastermix

30x Ansatz =585µl (1x Ansatz =19.5µl) Primer: mCD80
441.6µl Wasser
60µl 10x Puffer (15mM MgCl ₂)
15µl von jedem dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP: je 2mM): insg. 60µl
6µl Primer mCD80 (sense) (10pmol/µl)
6µl Primer mCD80 (antisense) (10pmol/µl)
4.5µl Primer MEN (sense) (10pmol/µl)
4.5µl Primer MEN (antisense) (10pmol/µl)
2.4µl Taq (5units/µl)

2.6.2 Häufig verwendete Reagenzien

Tabelle 2.13: Reagenzien: Zellkultur

Reagenzien: Zellkultur allg.	Hersteller	Aufbereitung
Zelllinie "T2" (174xCEM.T2) = humane Lymphoblasten -Zelllinie "T2"	Cell Biology LGC Standards ATCC-No.: CRL-1992	
RPMI 1640 500ml without L-Glutamine	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: BE12-167F	
Hepes Buffer, 1M, 100ml in 0.85% NaCl	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: BE17-737E	
NEAA, 100x 100ml	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: BE13-114E	
Na-Pyruvat solution, 100ml	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: BE13-115E	
Fetal Bovine Serum Gold 500ml (FBS Gold)	PAA / The Cell Culture Comp. Cat.No.: A15-151	Hitzeinakt.: 30 min. 56°C Wasserbad
Qualified FBS USDA Approved	Invitrogen Cat.No.: 10437-036	Hitzeinakt.: 30 min. 56°C Wasserbad
Penicillin/Streptomycin 500ml, 20.000units/ml Pen + 20.000µg/ml Strep	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: 09-757F	
L-Glutamine, 500ml, 200mM solution in 0.85% NaCl	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: 17-605F	
DMSO, Dimethyl sulfoxide BioReagent for molecular biology, ≥99.9%	SIGMA ALDRICH Cat.No.: D8418	
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS), (1x), 500ml without Ca and Mg, 0.0095M	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: BE17-512F	
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS), (1x), 500ml with Ca and Mg, 0.0095M	LONZA / BioWhittaker Cat.No.: BE17-513F	
Albumin Bovine Fraction V (BSA), MW 66338, 100GM	MP Biomedicals LCC / Cat.No.: 160060	

Tabelle 2.14: Reagenzien: Zytokine

Zytokine: BM-DC	Hersteller	Aufbereitung
Recombinant Murine IL-4, 10µg, lyophilized	PeptoTech Cat.No.: 214-14	10µg IL-4 + 50µl Aqua a.i.+ 350µl PBS (+Ca, Mg) = 400µl [25µg/ml]
Recombinant Murine GM-CSF 10µg, lyophilized	PeptoTech Cat.No.: 315-03	10µg GM-CSF + 50µl Aqua a.i.+ 350µl PBS (+Ca, Mg) = 400µl [25µg/ml]
Lipopolysaccharide (LPS) 1mg, lyophilized	SIGMA ALDRICH Product Number L4516	1mg LPS + 1ml RPMI =1ml [1mg/ml]

Tabelle 2.15: Reagenzien: FACS-Analyse

Reagenzien: FACS-Analyse	Hersteller	Aufbereitung
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block) 0.5mg, [0.5mg/ml]	BD Biosciences Cat.No.: 553142	
PE anti-mouse H-2Db, 50µg	BioLegend Cat.No.: 111507	
Sheath: BD FACSTFlow™ solution		
Cleaning: BD FACSTM Clean		
Rinsing: BD FACSTM shutdown solution		
BD Calibrite™ beads	BD Biosciences Cat.No.: 340 487	

Tabelle 2.16: Reagenzien: PCR

Reagenzien: PCR	Hersteller	Aufbereitung
10x PCR Buffer (15mM MgCl ₂)	SIGMA ALDRICH Cat.No.: P2192	
dNTP Set (100mM each A, T, C, G) 4x25µl	GE Healthcare Life Science Cat.No.: 28-4065-51	
mCD80 (sense) 5'- CAA ACA ACA GCC TTA CCT TCG G -3' (22)	Eurofins MWG/Operon	in gelöster Form [50pmol/µl]
mCD80 (antisense) 5'- GCC TCC AAA ACC TAC ACA TCC T -3' (22)	Eurofins MWG/Operon	in gelöster Form [50pmol/µl]
MEN Gen (sense) 5'- GCC TCA CCT ACT TTC CCG TGG -3' (21)	Eurofins MWG/Operon	in gelöster Form [50pmol/µl]
MEN Gen (antisense) 5'- TCC ATA TGA CAT CGG AGA CC -3' (20)	Eurofins MWG/Operon	in gelöster Form [50pmol/µl]
Taq DNA Polymerase from <i>Thermus aquaticus</i> (5units/µl)	SIGMA ALDRICH Cat.No.: D1806	

Tabelle 2.17: Reagenzien: DNA-Isolation, Gelelektrophorese

Reagenzien: DNA-Isolation Gelelektrophorese	Hersteller	Aufbereitung
Sodium Hydroxide (NaOH) 1N (40/L)	SIGMA ALDRICH Cat.No.: 59332C	
SDS Solution, Molecular Biology Grade (10% w/v), 500ml	Promega Cat.No.: V6553	
Proteinase K from Engyodontium album, lyophilized	SIGMA ALDRICH Cat.No.:P2308	gelöst in sterilem H ₂ O [10mg/ml]
EDTA disodium salt (dihydrate), FW 372.2), 500g	Promega Cat.No.: H5032	
Ultra Pure 1M Tris-HCl pH8.0, 1L	Invitrogen Cat.No.: 15568025	
Boric Acid (mw 61.83) 500g	SIGMA ALDRICH Cat.No. B6768	
NuSieve 3:1 Agarose	Cambrex Cat.No.: 50094	
111608 Ethidiumbromid 1%, 30ml	Merck Chemicals Cat.No.: 1116080030	
TrackIt Cyan/Yellow Loading Buffer (3x0.5ml)	Invitrogen Cat.No.:10482-035	
TrackIt 50bp DNA ladder (50-800bp), 100 applications	Invitrogen Cat.No.: 10488-043	
Ultra Pure DNase/RNase-free distilled water	Invitrogen Cat.No.: 10977035	

Tabelle 2.18: Reagenzien: Peptidimmunisierung

Reagenzien: Peptidimmunisierung	Hersteller	Aufbereitung
GP 33-41 (sequence: KAVYNFATM) Purity >80%, 15mg	Bio Synthesis, Inc. LOT-Nr.: T2279-3	s. Kap. 2.2.2, Tab. 2.2
GP 276-286, (sequence: SGVENPGGYCL) Purity >80%, 15mg	Bio Synthesis, Inc. LOT-Nr.: T2279-4	s. Kap. 2.2.2, Tab. 2.3
NP 396-404, (sequence: FQPQNGQFI) Purity >80%, 15mg	Bio Synthesis, Inc. LOT-Nr.: T2279-7	s. Kap. 2.2.2, Tab. 2.4
FNL 9, (sequence: FQDENYLYL) Purity >80%, 15mg	Bio Synthesis, Inc. LOT-Nr.: T2279-8	s. Kap. 2.2.2, Tab. 2.5
IGRP 241-249, (sequence: KWCANPDWI) Purity >80%, 15mg	Bio Synthesis, Inc. LOT-Nr.: T2279-1	s. Kap. 2.2.2, Tab. 2.6
mIGRP 225-233, (sequence: LRLFGIDLL) Purity >80%, 15mg	Bio Synthesis, Inc. LOT-Nr.: T2279-2	s. Kap. 2.2.2, Tab. 2.7
Imject Alum, 50ml	Pierce Cat.No.: 77161	

2.6.3 Häufig verwendete Geräte

Elektrophoresis Power Supply - EPS 300

- Pharmacia Biotech/ Cat.No.: 18-1123-97

Agagel Mini

- Whatman, Biometra/ Code-No.: 020-000
- Combs (1.0mm), 1/4, Cat.No.: 020-003
- Combs (1.5mm), 12/8, Cat.No.: 020-002
- Gel Tray with Ruler 6.5x9cm, Cat.No.: 020-008

PTC-100 Programmable ThermalController

- MJ Research, Inc.

FACSCalibur

- BD Biosciences

BD CellQuest Pro Software

- BD Biosciences

Hood

- Haereus, Hera Safe, Type KS 18, 1/PE AC, EN 12469: 2000, Klasse II, NF X 44-201: Type II, Cat. 2, 1800x780x627mm

Zentrifuge (groß)

- Haereus, Multifuge 3 S-R

Zentrifuge (klein)

- Eppendorf Centrifuge 5415R

Brutschrank

- Haereus Instruments
- Function Line
- Typ BB 16 CU
- Bestellnr.: 51008333

Blutzuckermessgerät

- Bayer Ascensia
- Contour Blutzuckermessgerät
- SN 7364151

2.7 Statistik

Bei den Zellimmunisierungen wurde eine durch vorausgegangene Poweranalyse als statistisch relevant berechnete Versuchsgruppengröße von 12 Mäusen pro Peptid gewählt, da mit der Annahme einer Standardabweichung von 20% bei einer Versuchstierzahl von 12 pro Gruppe mit einer Power von 80% die Ablehnung der Nullhypothese in Bezug auf die alternative Hypothese mit einem 0.05 type I error möglich war. Für die statistische Auswertung wurde das Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc. Chicago, USA) verwendet. Unterschiede wurden bei einem p-Wert ≤ 0.05 als signifikant eingestuft.

3

Ergebnisse

3.1 Zellimmunisierungen

3.1.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

In die Versuchsreihe der Immunisierungen mit den Peptid-beladenen reifen dendritischen Zellen wurden insgesamt 70 RIP-CD80+GP+ Mäuse eingeschlossen. Sowohl die potentiell Diabetes-relevanten Peptide FNL 9, mIGRP 225-233 und IGRP 241-249 als auch die Kontrollpeptide LCMV-GP 33-41, LCMV-GP 276-286 (= dominante bzw. subdominante Positivkontrolle, zytotoxische Epitope aus dem Positivautoantigen) und das LCMV-NP 396-404 (= Negativkontrolle, Peptid aus dem LCMV-Nukleoprotein, welches im verwendeten Mausmodell nicht präsent ist) wurden untersucht (s. Kap. 2.2, Kap. 2.3). Bei der Verteilung in die Untersuchungsgruppen wurde das "litter-matching" Prinzip angewendet (s. Kap. 2.1.10), um nachweisbare Effekte unabhängig von Besonderheiten eines Wurfes zu machen.

Es wurden 49 (70%) männliche und 21 (30%) weibliche Tiere in die Versuchsreihe eingeschlossen.

Das Alter der Versuchstiere lag bei Immunisierung zwischen 8.3 und 18.4 Wochen (arithmetisches Mittel: 12.0 Wochen).

Um zwei unabhängige Versuche auswerten zu können und damit die Aussagekraft der Versuchsergebnisse zu erhöhen, wurden zwei identisch aufgebaute Experimente zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt.

Für die Peptide LCMV-NP 396-404, LCMV-GP 276-286, FNL 9, mIGRP 225-233 und IGRP 241-249 wurde eine statistisch gepowerte Versuchsgruppengröße von insgesamt 12 Tieren pro Peptid gewählt (s. Kap. 2.7). Davon wurden in dem ersten Versuchsteil je 8 Tiere pro Peptid und in dem zweiten Experiment je 4 Tiere immunisiert.

Für das dominante Epitop LCMV-GP 33-41 wurden nur 10 Tiere eingeschlossen, da wir auf valide Ergebnisse aus analogen Versuchen am National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA (NIH, Animal Study Proposal #K127-TAB-03) zurückgreifen konnten. Im ersten Versuch wurden 4 und im zweiten Teil 6 Mäuse verwendet.

Die Versuchstiere wurden bis zu 20 Wochen post Immunisierung (= Versuchsende) bzw. bis zur Diabetesmanifestation nachverfolgt (s. Kap. 2.1.7).

Die Ergebnisse der Versuche am Helmholtz Zentrum München (HMGU) wurden auf folgende Fragen untersucht: Können die *in vitro* als diabetogen beschriebenen Peptide tatsächlich *in vivo* Diabetes auslösen? Gibt es Differenzen zwischen der in der Literatur beschriebenen Diabetogenität und unseren Ergebnissen? Wie viele Mäuse entwickeln in welchem Zeitraum Diabetes? Ist das Auftreten von Diabetes bzw. die Dynamik des Krankheitsverlaufs alters- oder geschlechtsabhängig?

Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse der HMGU-Experimente mit Resultaten aus analogen Versuchen am NIH, um zu explorieren, ob auch in verschiedenen Räumlichkeiten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Reproduzierbarkeit der Versuchsreihe gegeben war. In den Versuchen am NIH wurden ebenfalls sowohl die potentiell Diabetes-relevanten Peptide FNL 9, mIGRP 225-233 und IGRP 241-249 als auch die Kontrollpeptide LCMV-GP 33-41 und LCMV-GP 276-286 untersucht. Es lagen jedoch keine Daten zu der Negativkontrolle LCMV-NP 396-404 vor. Insgesamt wurden dort 86 RIP-CD80+GP+ Mäuse mit Peptid-beladenen BM-DC immunisiert. Da die Peptide in den Versuchen am NIH zusätzlich in mehreren verschiedenen Konzentrationen appliziert wurden, konnten zur Wahrung der Vergleichbarkeit nur die Daten der Peptide in gleichen Konzentrationen wie am HMGU (0.1µM für LCMV-GP 33-41 sowie 10µM für die restlichen Peptide) verwendet werden. Damit wurden letztlich 41 Tiere aus dem NIH in die Vergleichsgruppe eingeschlossen (LCMV-GP 33-41: n=12 Mäuse, LCMV-GP 276-286: n=2 Mäuse, FNL 9: n=13 Mäuse, IGRP 241-249: n=5 Mäuse, mIGRP 225-233: n=9 Mäuse). Für die Zellimmunisierungen wurden am NIH ebenfalls BM-DC aus dem Knochenmark von B6.129S7-Rag1tmMom/J Spendermäusen benutzt.

3.1.2 Übersicht zu den Versuchsergebnissen der Zellimmunisierungen am HMGU

Potentiell diabetogene Peptide

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die *in vivo* Diabetogenität der Peptide FNL 9, IGRP 241-249, mIGRP 225-233 nachgewiesen werden. Die höchste Diabetesrate zeigte mit 66.7% das Peptid mIGRP 225-233. Mit einer Diabetesrate von 41.7% war FNL 9 das zweitpotenteste der als Diabetes-induzierend beschriebenen Peptide. 25% der Mäuse entwickelten nach Immunisierung mit dem Peptid IGRP 241-249 Diabetes.

Kontrollpeptide

Die höchste Diabetesrate mit 100% war bei den Zellimmunisierungen mit der Positivkontrolle, dem dominanten Epitop LCMV-GP 33-41, zu beobachten.

Bei Immunisierungen mit dem subdominanten Epitop LCMV-GP 276-286 zeigte sich im Vergleich eine niedrigere Diabetesrate mit insgesamt 91.7% diabetischen Tieren. Aus ungeklärten Gründen entwickelten auch 3 Tiere aus der Gruppe der mit dem Negativkontrollpeptid LCMV-NP 396-404 immunisierten Mäuse eine diabetische Stoffwechsellage. Damit lag die Diabetesrate hier bei 25%.

Als Graphik ist untenstehend die Übersicht über die Versuche der Zellimmunisierungen am HMGU gesamt sowie im Vergleich zu den einzelnen Versuchsabschnitten aufgeführt (Abb. 3.1, Abb. 3.2). Im Weiteren werden die Ergebnisse für die jeweiligen Peptide im Detail einzeln aufgearbeitet sowie die Resultate der Versuchsteile miteinander und mit den Ergebnissen des NIH verglichen (s. Abb. 3.8).

3.1.3 Zellimmunisierungen mit den Kontrollpeptiden: LCMV-GP 33-41 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2

Das dominante T-Zellepitop LCMV-GP 33-41 des Kontrollantigens LCMV-GP wurde in einer Konzentration von 0.1µM auf die BM-DC geladen und insgesamt 10 Mäusen [davon 7 (70%) männliche und 3 (30%) weibliche Tiere im Alter von 9.3 bis 12.3 (Mittelwert 11.2) Wochen bei Immunisierung] appliziert (s. Tab. 3.1). Als Donatoren für die

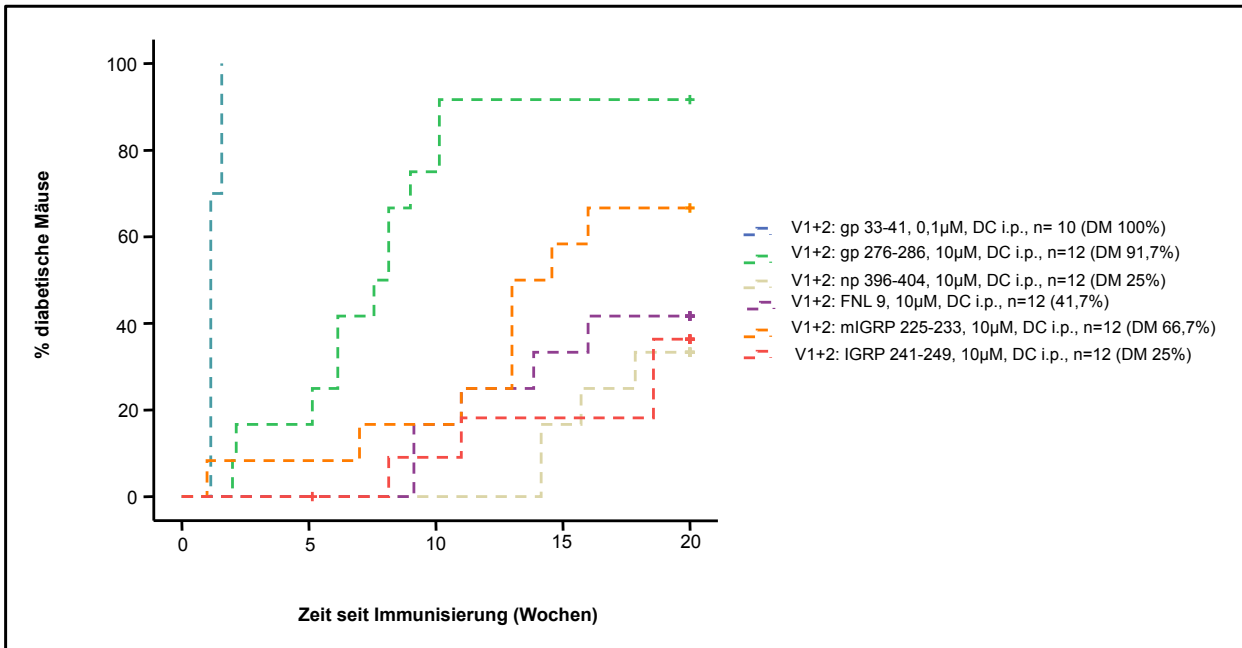


Abbildung 3.1: Zellimmunisierungen HMGU: Versuch 1+2 gesamt (V1+V2)

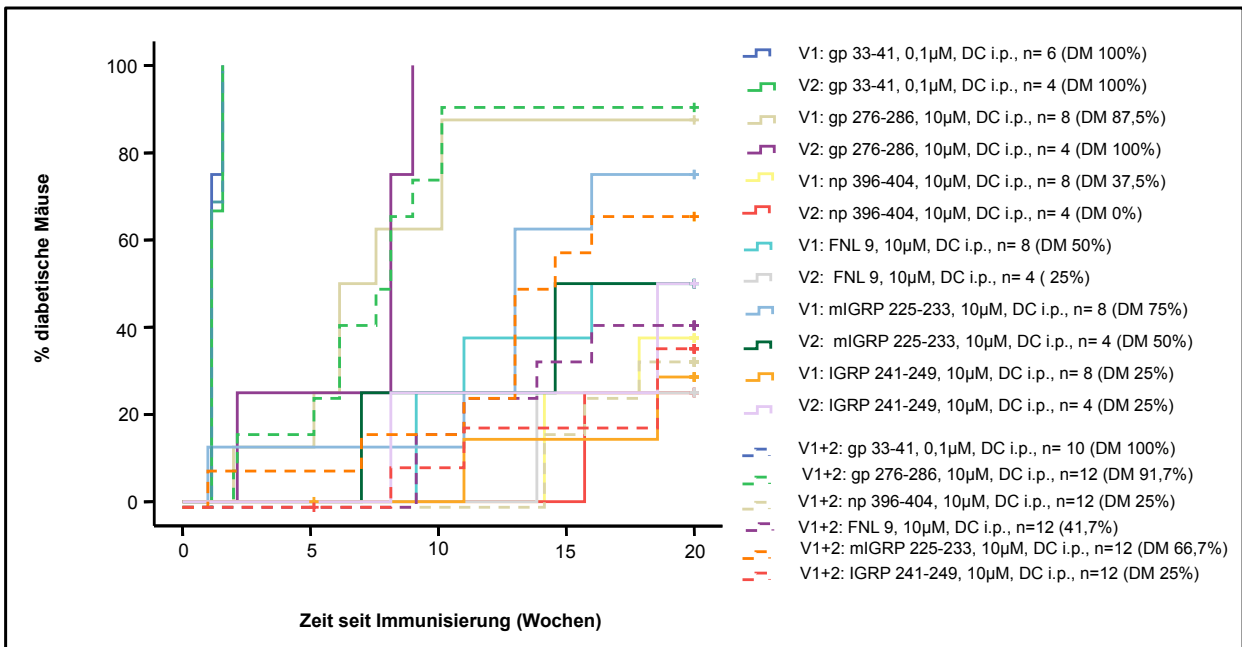


Abbildung 3.2: Zellimmunisierungen HMGU: Versuch 1+2 gesamt (V1+V2) vs. Versuch 1 (V1) vs. Versuch 2 (V2)

BM-DC des ersten Versuchsteils dienten 2 weibliche RIP-GP+ Mäuse im Alter von 10 Wochen (Pilotstudie zur Etablierung der BM-DC Isolation aus dem Knochenmark, s. Kap. 2.3.2).

Im ersten Versuchsteil wurden 4 RIP-CD80+GP+ Mäuse [2 Männchen (50%), 2 Weibchen (50%)] im Alter von 11.4 bis 12.3 (Mittelwert: 12.0) Wochen immunisiert. Davon entwickelten alle Tiere innerhalb von 8 bis 11 Tagen, im Mittel nach 9 Tagen, Diabetes. Im zweiten Experiment wurden 6 Tiere [5 Männchen (83.3%), 1 Weibchen (16.7%)] im Alter von 9.3 bis 12 (Mittelwert: 10.7) Wochen mit Peptid-beladenen dendritischen Zellen behandelt. Die BM-DC stammten aus dem Zellpool der insgesamt 6 weiblichen, 10 Wochen alten B6.129S7-Rag1tmMom/J Mäusen (s. Kap. 2.1.4, Kap. 2.3.2). Auch hier wurden alle Mäuse innerhalb von 8 bis 11 Tagen, im Schnitt nach 9 Tagen, diabetisch. Betrachtet man die Ergebnisse der beiden Versuchsteile gemeinsam, so entwickelten alle RIP-CD80+GP+ Mäuse (100%) unabhängig vom Geschlecht nach 8 bis 11 Tagen (Mittelwert: 9 Tage) Diabetes (s. Abb. 3.9). Insgesamt 7 Mäuse zeigten bereits nach 8 Tagen diabetische Glukosewerte, hier lag der Altersdurchschnitt bei 13.1 Wochen bei Immunisierung. 3 Mäuse mit dem Durchschnittsalter von 10.9 Wochen zum Zeitpunkt der Immunisierung wurden erst nach 11 Tagen diabetisch.

Mittels der Experimente wurde nebenbefundlich deutlich, dass die BM-DC Isolation sowohl aus den RIP-GP+ als auch den B6.129S7-Rag1tmMom/J Mäusen effektiv für die Zellimmunisierungen genutzt werden konnte und innerhalb kurzer Zeit Diabetes induzierte.

Außerdem zeigte sich, dass die beiden am HMGU zeitlich unabhängig durchgeführten, jedoch identisch aufgebauten Experimente zu sehr ähnlichen Ergebnissen führten, da sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Experimentresultaten feststellen ließ ($p=0.789$). Damit waren die Ergebnisse reproduzierbar und unabhängig von Zeitpunkt und Durchführung der Experimente. Im Vergleich zu allen anderen Peptidimmunisierungsergebnissen zeigte sich eine signifikant höhere Diabetesrate bei dem dominanten Positivkontrollpeptid LCMV-GP 33-41 ($p=0.000$).

3.1.4 LCMV-GP 33-41: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH

Am NIH wurden RIP-CD80+GP+ Mäuse im Alter von 10.1 bis 13.4 Wochen (Mittelwert 12.4 Wochen) bei Immunisierung verwendet. Die Gruppe bestand aus 12 Mäusen

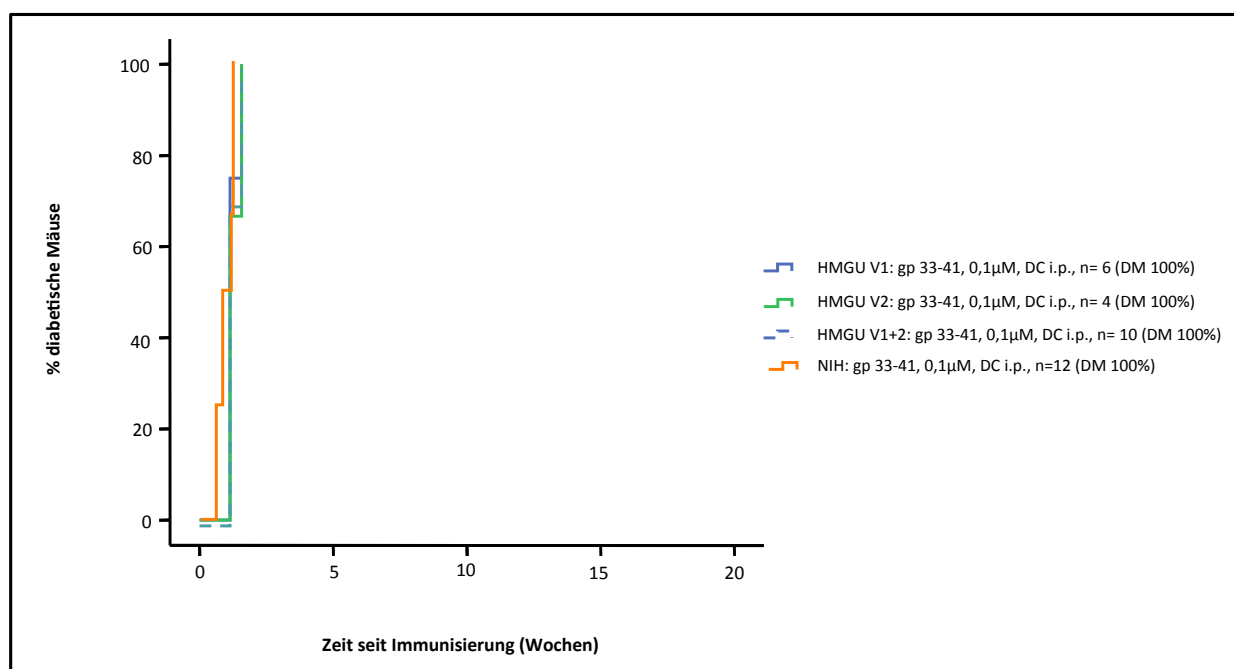


Abbildung 3.3: Zellimmunisierungen LCMV-GP 33-41: HMGU Versuch 1+2 gesamt (V1+V2) vs. Versuch 1 (V1) vs. Versuch 2 (V2) vs. NIH

mit je 6 männlichen und weiblichen Tieren, von denen alle (100%) innerhalb von 7 bis 15 Tagen (im Mittel 12 Tage) Diabetes entwickelten. Im Vergleich zu den selbst durchgeführten Versuchen am HMGU lässt sich Folgendes feststellen: In den Experimenten am NIH konnte mit dem dominanten T-Zellepitop LCMV-GP 33-41 0.1 μ M geladen auf BM-DC genauso zuverlässig wie am HMGU Diabetes induziert werden. Es ließ sich keine alters- oder geschlechtsassoziierte Diabetesentwicklung feststellen (s. Abb. 3.9). Ebenfalls war der Zeitraum bis zum Auftreten einer diabetischen Stoffwechsellage vergleichbar mit den Resultaten des HMGU. Am NIH zeigten die Tiere im Mittel nach 12 Tagen diabetische Glukosewerte verglichen mit einer Diabetesmanifestation nach durchschnittlich 9 Tagen am HMGU. Somit konnte gezeigt werden, dass die Durchführung der Zellimmunisierungen mit LCMV-GP 33-41 sowohl zu verschiedenen Zeitpunkten als auch in unterschiedlichen Räumlichkeiten vergleichbare Ergebnisse lieferte und die Versuche damit komplikationslos reproduzierbar waren (s. Abb. 3.3).

Tabelle 3.1: Zellimmunisierungen: LCMV-GP 33-41

Peptid: LCMV-GP 33-41	HMGU gesamt	HMGU Versuch 1	HMGU Versuch 2	NIH gesamt
Tierzahl gesamt	10	4	6	12
- davon ♂	7 (70%)	2 (50%)	5 (83,3%)	6 (50%)
- davon ♀	3 (30%)	2 (50%)	1 (16,7%)	6 (50%)
Altersrange (in Wochen)	9.3-12.3	11.3-12.3	9.3-12	10.1-13.4
MW. Alter (in Wochen)	11.2	12	10.7	12.4
Diabetesrate gesamt	10/10 (100%)	4/4 (100%)	6/6 (100%)	12/12 (100%)
- davon ♂	7/10 (70%)	2/4 (50%)	5/6 (83.3%)	6/12 (50%)
- davon ♀	3/10 (30%)	2/4 (50%)	1/6 (16.7%)	6/12 (50%)
Diabetesrate ♂	7/7 (100%)	2/2 (100%)	5/5 (100%)	6/6 (100%)
Diabetesrate ♀	3/3 (100%)	2/2 (100%)	1/1 (100%)	6/6 (100%)
Altersrange bei Imm. (in Wo.)	9.3-12.3	11.3-12.3	9.3-12	10.1-13.4
MW. Alter bei Imm. (in Wo.)	11.2	12	10.7	12.4
Zeit bis DM pos. (in Tg.)	8.0-11.0	8.0-11.0	8.0-11.0	7.0-15.0
MW. Zeit bis DM pos. (in Tg.)	9	9	9	12

3.1.5 Zellimmunisierungen mit den Kontrollpeptiden: LCMV-GP 276-286 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2

Für die Zellimmunisierungen mit dem subdominanten T-Zellepitop LCMV-GP 276-286 des Modellantigens LCMV-GP wurden 10 μ M Peptid-beladene BM-DC aus dem Zellpool der insgesamt 6 weiblichen, 10 Wochen alten B6.129S7-Rag1tmMom/J Mäusen (JAX Stock# 002216) verwendet. Die Versuchsgruppe bestand aus 12 Mäusen [davon 7 Männchen (58.3%) und 5 Weibchen (41.7%)] im Alter von 8.9 bis 18.4 (Mittelwert: 12.8) Wochen bei Immunisierung. Insgesamt entwickelten 11 der 12 Mäuse (91.7%) in einem Zeitraum von 14 bis 71 Tagen (im Mittel nach 48 Tagen) Diabetes. Lediglich ein Männchen erkrankte über den Untersuchungszeitraum von 20 Wochen nach Immunisierung nicht. Damit lag die Diabetesrate der Männchen bei 85.7% und bei 100% für die Weibchen.

Im ersten Versuch wurden 8 Mäuse im Alter von 8.9 bis 18.4 Wochen (5 Männchen und 3 Weibchen) immunisiert. 7 der 8 Tiere (87.5%) entwickelten innerhalb von 14 bis 71 (Mittelwert: 47) Tagen Diabetes. Nur beim oben genannten Männchen manifestierte sich kein Diabetes.

Das zweite Experiment bestand aus einer Versuchsgruppe von 4 Mäusen (je 2 Männchen und Weibchen) im Alter von 9.9 bis 12.3 (Mittelwert: 11.5) Wochen zum Zeitpunkt der Immunisierung. Bei allen Mäusen (100%) trat zwischen 15 und 63 (Mittelwert: 48) Tagen Diabetes auf (s. Tab. 3.2, Abb. 3.4).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass auch die Immunisierung mit dem subdominanten Peptid bei den RIP-CD80+GP+ Mäusen zuverlässig Diabetes induzierte (91.7% der Tiere entwickelten Diabetes). Jedoch war der Zeitraum bis zur Erkrankung wesentlich größer (im Mittel 48 Tage) als bei Verwendung des dominanten Peptids LCMV-GP 33-41. Hier waren die Tiere durchschnittlich nach 9 Tagen diabetisch.

Im Vergleich der beiden LCMV-GP 276-286 Versuche miteinander zeigte sich im ersten Experiment eine deutlich größere Altersspanne (8.9 bis 18.4 Wochen bei Immunisierung) im Gegensatz zum zweiten Versuch (9.9 bis 12.3 Wochen bei Immunisierung), jedoch war kein signifikanter Unterschied in der Diabetesinduktion der beiden Versuchsteile nachweisbar ($p=0.632$). Ebenfalls war kein Geschlecht bevorzugt erkrankt (s. Abb. 3.10). Die Diabetesrate der Männchen lag bei 85.7% (6 der 7 Männchen erkrankten)

und bei 100% für die weiblichen Mäuse (5 der 5 Tiere wurden diabetisch). Vergleicht man die Versuchsergebnisse beider Versuchsteile des LCMV-GP 276-286 mit den Ergebnissen aus beiden Versuchen vom LCMV-GP 33-41 Peptid, zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied bzgl. der Diabetesinduktionsrate ($p=0.000$). Gegenüber den Ergebnissen aus den anderen Peptidversuchen war eine signifikant höhere Diabetesrate bei LCMV-GP 276-286 zu verzeichnen [$p=0.000$ (LCMV-NP 396-404); $p=0.000$ (FNL 9); $p=0.006$ (mIGRP 225-233); $p=0.000$ (IGRP 241-249)].

3.1.6 LCMV-GP 276-286: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH

In die Versuchsgruppe des NIH wurden lediglich 2 Tiere im Alter von 10.1 Wochen bei Immunisierung, davon 1 männliche und 1 weibliche Maus, eingeschlossen. Beide Versuchstiere wurden nach 20 Tagen diabetisch (100%). Bei den Experimenten am HMGU war bei den Tieren zwar eine größere Altersspanne auffällig (8.9 bis 18.4 Wochen zum Zeitpunkt der Immunisierung), der Mittelwert des Alters lag jedoch bei 12.8 Wochen (s. Tab. 3.2). Im Vergleich beider Experimente (HMGU versus NIH) zeigte sich wiederum eine ähnliche Diabetesrate (100% am NIH zu 91.7% am HMGU). Jedoch differierte der Zeitraum bis zum Auftreten von Diabetes. Am NIH zeigten die Tiere bereits nach 20 Tagen diabetische Glukosewerte, am HMGU erst nach 48 Tagen (s. Abb. 3.4). Da die Gruppe der Tiere am NIH nur aus 2 Tieren bestand, lässt sich hieraus keine aussagekräftige Schlussfolgerung ziehen.

3.1.7 Zellimmunisierungen mit den Kontrollpeptiden: LCMV-NP 396-404 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2

Als Negativkontrolle wurde das LCMV-NP 396-404 Epitop (Peptid aus dem LCMV-Nukleoprotein, welches im verwendeten Mausmodell nicht präsent ist) verwendet. Es wurde in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ auf die BM-DC geladen und insgesamt 12 Mäusen [davon 10 (83.3%) männliche und 2 (16.7%) weibliche Tiere im Alter von 8.3 bis 15.9 (Mittelwert 12.3) Wochen] appliziert.

Im ersten Versuchsteil wurden 8 RIP-CD80+GP+ Mäuse [7 Männchen (87.5%), 1 Weibchen (12.5%)] im Alter von 8.3 bis 15.9 (Mittelwert: 10.2) Wochen immunisiert. Davon entwickelten 3 der 8 Versuchstiere (37.5%) innerhalb von 99 bis 125 Tagen (im

Tabelle 3.2: Zellimmunisationen: LCMV-GP 276-286

Peptid: LCMV-GP 276-286	HMGU gesamt	HMGU Versuch 1	HMGU Versuch 2	NIH gesamt
Tierzahl gesamt	12	8	4	2
- davon ♂	7 (58.3%)	5 (62.5%)	2 (50%)	2 (100%)
- davon ♀	5 (41.7%)	3 (37.5%)	2 (50%)	0 (0%)
Altersrange (in Wochen)	8.9-18.4	8.9-18.4	9.9-12.3	10.1
MW. Alter (in Wochen)	12.8	14	11.5	10.1
Diabetesrate gesamt	11/12 (91.7%)	7/8 (87.5%)	4/4 (100%)	2/2 (100%)
- davon ♂	6/11 (54.5%)	4/7 (57.1%)	2/4 (50%)	2/2 (100%)
- davon ♀	5/11 (45.5%)	3/7 (42.9%)	2/4 (50%)	0/2 (0%)
Diabetesrate ♂	6/7 (85.7%)	4/5 (80%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
Diabetesrate ♀	5/5 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	0/0 (0%)
Altersrange bei Imm. (in Wo.)	8.9-18.4	8.9-18.4	9.9-12.3	10.1
MW. Alter bei Imm. (in Wo.)	12.9	14.2	11.5	10.1
Zeit bis DM pos. (in Tg.)	14-71	14-71	15-63	20
MW. Zeit bis DM pos. (in Tg.)	48	47	48	20

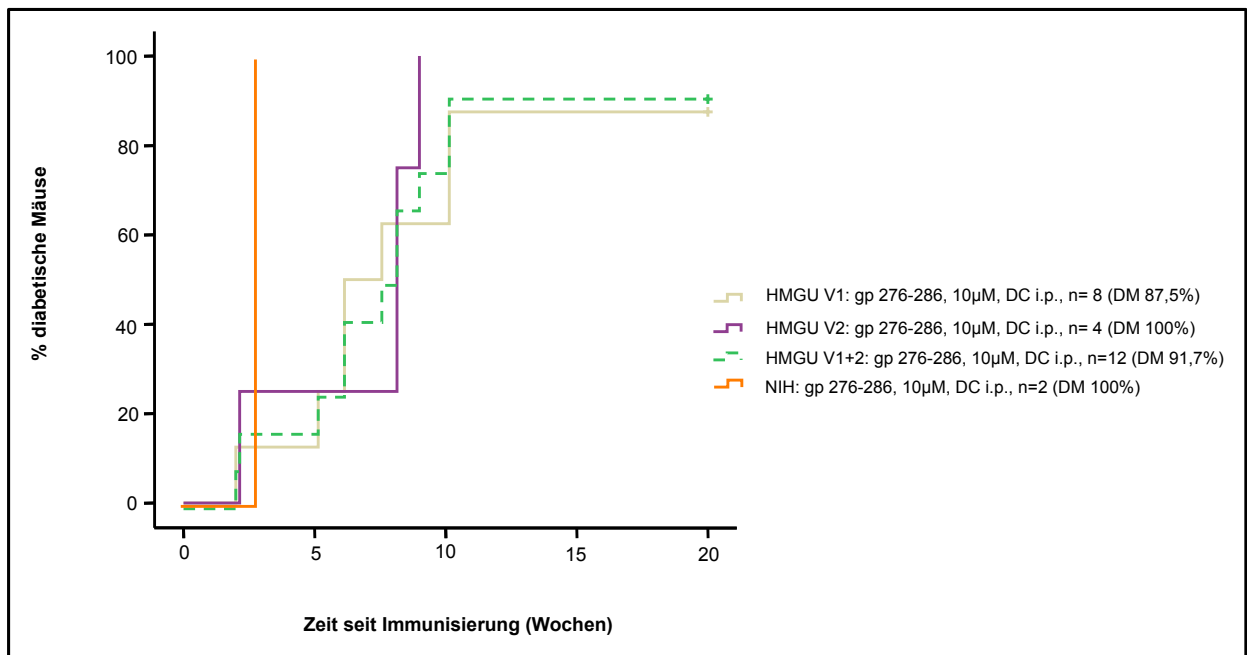


Abbildung 3.4: Zellimmunisationen LCMV-GP 276-286: HMGU Versuch 1+2 gesamt (V1+V2) vs. Versuch 1 (V1) vs. Versuch 2 (V2) vs. NIH

Mittel nach 108) Tagen Diabetes. Es waren nur männliche Mäuse betroffen, sodass die Diabetesrate der Männchen in diesem Teilversuch bei 42.9% und bei den Weibchen entsprechend bei 0% lag.

Im zweiten Experiment wurden 4 Tiere [3 Männchen (75%), 1 Weibchen (25%)] im Alter von 9.9 bis 11.7 (Mittelwert: 11.3) Wochen behandelt. Bei keinem der Tiere trat eine diabetische Stoffwechsellaage auf (s. Tab. 3.3).

Werden die Ergebnisse der beiden Versuchsteile gemeinsam betrachtet, so entwickelten 25% der RIP-CD80+GP+ Mäuse nach durchschnittlich 108 Tagen Diabetes. Die Diabetesrate der männlichen Tiere lag bei 30%, keine der weiblichen Mäuse zeigte diabetische Glukosewerte (s. Abb. 3.11). Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse in beiden Versuchsteilen (alle diabetischen Mäuse gehörten zu den Versuchstieren des ersten Experiments) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0.667$) zwischen beiden Versuchsgruppen. Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Diabetesrate im Vergleich zu LCMV-GP 33-41 ($p<0.001$), LCMV-GP 276-286 ($p<0.001$) und eine niedrigere Rate im Vergleich zu mIGRP 225-233 ($p<0.05$). Verglichen mit den restlichen beiden Peptiden FNL 9 ($p=0.513$) und IGRP 241-249 ($p=0.898$) war kein signifikanter

Tabelle 3.3: Zellimmunisationen: LCMV-NP 396-404

Peptid: LCMV-NP 396-404	HMGU gesamt	HMGU Versuch 1	HMGU Versuch 2	NIH gesamt
Tierzahl gesamt	12	8	4	
- davon ♂	10 (83.3%)	7 (87.5%)	3 (75%)	
- davon ♀	2 (16.7%)	1 (12.5%)	1 (25%)	
Altersrange (in Wo)	8.3-15.9	8.3-15.9	9.9-11.7	keine
MW. Alter (in Wo)	12.3	10.2	11.3	Daten
				aus
Diabetesrate gesamt	3/12 (25%)	3/8 (37.5%)	0/4 (0%)	NIH
- davon ♂	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/0 (0%)	vorliegend
- davon ♀	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/0 (0%)	
Diabetesrate ♂	3/10 (30%)	3/7 (42.9%)	0/3 (0%)	
Diabetesrate ♀	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/1 (0%)	
Altersrange bei Imm. (in Wo.)	8.3-15.9	8.3-15.9	/	
MW. Alter bei Imm. (in Wo.)	13.3	13.3	/	
Zeit bis DM pos. (in Tg.)	99-125	99-125	/	
MW. Zeit bis DM pos. (in Tg.)	108	108	/	

Unterschied bzgl. der Diabetesinduktion nachweisbar.

3.1.8 LCMV-NP 396-404: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH

Aufgrund von nicht vorhandenen Daten zu Versuchen mit dem Peptid LCMV-NP 396-404 am NIH konnte kein Vergleich gezogen werden.

3.1.9 Zellimmunisationen mit den potentiell diabetogenen Peptiden: FNL 9 HMGU Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2

Für die Zellimmunisationen mit dem in der Literatur als diabetogen beschriebenen CD8+ T-Zellepitop FNL 9 wurden 10µM Peptid-beladene BM-DC verwendet. Die Gruppengröße betrug 12 Mäuse [davon 8 Männchen (66.7%) und 4 Weibchen (33.3%)] im

Alter von 8.3 bis 18.4 (Mittelwert: 11) Wochen bei Immunisierung. Insgesamt zeigten 5 der 12 Mäuse (41.7%) in einem Zeitraum von 64 bis 112 Tagen (im Mittel nach 82 Tagen) diabetische Blutzuckerwerte.

Im ersten Versuch wurden 8 Mäuse im Alter von 8.3 bis 18.4 [(Mittelwert: 10.5) Wochen (5 Männchen (62.5%) und 3 Weibchen (37.5%)] immunisiert. Je 2 männliche und weibliche Tiere entwickelten innerhalb von 64 bis 112 (Mittelwert: 79) Tagen Diabetes. Damit lag die Diabetesrate des gesamten ersten Versuchsteils bei 50%, für die Männchen allein bei 40% und für die Weibchen bei 66.7%.

Das zweite Experiment bestand aus einer Versuchsgruppe von 4 Mäusen (3 Männchen und 1 Weibchen) im Alter von 9.9 bis 12.3 (Mittelwert: 11.5) Wochen zum Zeitpunkt der Immunisierung. 1 männliches Versuchstier entwickelte nach 97 Tagen erhöhte Glukosewerte. Damit war für den zweiten Versuchsteil eine Gesamtdiabetesrate von 25%, für die männlichen Tiere von 33.3% und weiblichen Tiere von 0% zu verzeichnen. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass durch Immunisierung mit dem Peptid FNL 9 bei den RIP-CD80+GP+ Mäusen erfolgreich Diabetes induziert werden konnte. Insgesamt entwickelten 41.7% der behandelten Tiere Diabetes. Im ersten Versuchsteil wurden 50% (4 von 8) der Tiere diabetisch, im zweiten Experiment zeigten 25% (1 von 4) der Mäuse eine diabetische Stoffwechsellaage. Die Diabetesrate lag bei den Männchen insgesamt bei 37.5% (3 der 8 männlichen Mäuse wurden diabetisch) und bei den Weibchen bei 50% (2 der 4 weiblichen Mäuse erkrankten an Diabetes). Es war damit auch hier keine geschlechtsspezifische Präferenz bezüglich der Diabetesinduktion auffällig (s. Abb. 3.12). Im Mittel erkrankten die Tiere nach 82 Tagen an Diabetes. Im ersten Versuch traten erhöhte Glukosewerte mit 79 Tagen im Durchschnitt etwas früher auf als bei der Maus im zweiten Experiment. Hier lag der Zeitraum bis zur Diabetesmanifestation bei 97 Tagen (s. Tab. 3.4, Abb. 3.5). Statistisch unterschieden sich die Ergebnisse beider Versuchsteile bzgl. der Diabetesrate nicht ($p=0.404$).

Die Resultate nach Immunisierungen mit dem dominanten Kontrollpeptid LCMV-GP 33-41 und dem subdominanten Epitop LCMV-GP 276-286 zeigten signifikant differente Ergebnisse bezogen auf die Diabetesinduktion im Vergleich zu den Versuchsergebnissen mit FNL 9 [$p<0.001$ (LCMV-GP 33-41); $p=0.025$ (LCMV-GP 276-286)]. Die Zellimmunisierungen unter Verwendung von LCMV-GP 33-41 führten in 100% der Fälle zu Diabetes, unter Verwendung von LCMV-GP 276-286 wurden 91.7% der

Versuchstiere diabetisch. Im Vergleich dazu lag die Diabetesrate mit FNL 9 mit 41.7% deutlich niedriger. Im Vergleich zur Negativkontrolle LCMV-NP 396-404 wurde keine signifikant höhere Diabetesrate festgestellt ($p= 0.513$).

3.1.10 FNL 9: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH

Werden die am HMGU erzielten Ergebnisse mit denen des NIH verglichen, so lässt sich Folgendes feststellen: Am NIH bestand die Versuchsgruppe aus 13 Tieren, davon waren 61.5% (8 Mäuse) männlich und 38.5% weiblich (5 Mäuse). Damit war die Verteilung ähnlich der Kohorte am HMGU mit insgesamt 12 Tieren und 66.7% Männchen, sowie 33.3% Weibchen. Mit einem Altersdurchschnitt von 10.8 Wochen bei Immunisierung am NIH und 11.0 Wochen am HMGU zeigte dieser Parameter ebenfalls geringfügige Unterschiede. Es zeigten sich jedoch unterschiedliche Geschlechterpräferenzen (s. Abb. 3.12). Die Mäuse erkrankten am HMGU ausgewogen mit einer Diabetesrate von 37.5% bei den männlichen und 50% bei den weiblichen Mäusen. Hingegen zeigte sich eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechts bezüglich Diabetesinduktion am NIH. Hier wurden 80% der Weibchen und nur 25% der Männchen diabetisch. Des Weiteren erkrankten die Mäuse am NIH deutlich früher. Diabetes manifestierte sich hier bei den Versuchstieren innerhalb von 49 bis 66 Tagen, im Mittel innerhalb von 58 Tagen. Am HMGU lag die Zeitspanne bis zum Auftreten von Diabetes zwischen 64 und 112 Tagen, durchschnittlich erkrankten die Tiere nach 82 Tagen. Mit einer Rate von 46.2% (6 von 13 Tieren) Diabeteserkrankungen am NIH verglichen mit 41.7% (5 von 12 Tieren) erkrankten Mäusen am HMGU zeigte sich, dass unter Verwendung des Epitops FNL 9 aus dem DMK-Antigen an beiden Orten effektiv Diabetes induziert werden konnte (s. Tab. 3.4, Abb. 3.5), mit statistisch vergleichbaren Ergebnissen ohne signifikanten Unterschied in der Diabetesinduktionsrate ($p= 0.439$). Die in der Literatur postulierte Diabetogenität des Peptids FNL 9 konnte *in vivo* bestätigt werden.

Tabelle 3.4: Zellimmunisierungen: FNL 9

Peptid: FNL 9	HMGU gesamt	HMGU Versuch 1	HMGU Versuch 2	NIH gesamt
Tierzahl gesamt	12	8	4	13
- davon ♂	8 (66.7%)	5 (62.5%)	3 (75%)	8 (61.5%)
- davon ♀	4 (33.3%)	3 (37.5%)	1 (25%)	5 (38.5%)
Altersrange (in Wochen)	8.3-18.4	8.3-18.4	9.9-12.3	6.0-15.0
MW. Alter (in Wochen)	11	10.5	11.5	10.8
Diabetesrate gesamt	5/12 (41.7%)	4/8 (50%)	1/4 (25%)	6/13 (46.2%)
- davon ♂	3/5 (60%)	2/4 (50%)	1/1 (100%)	2/6 (33.3%)
- davon ♀	2/5 (40%)	2/4 (50%)	0/1 (0%)	4/6 (66.7%)
Diabetesrate ♂	3/8 (37.5%)	2/5 (40%)	1/3 (33.3%)	2/8 (25%)
Diabetesrate ♀	2/4 (50%)	2/3 (66.7%)	0/1 (0%)	4/5 (80%)
Altersrange bei Imm. (in Wo.)	8.3-18.4	8.3-18.4	12.3	6.0-15.0
MW. Alter bei Imm. (in Wo.)	12.4	12.4	12.3	9.9
Zeit bis DM pos. (in Tg.)	64-112	64-112	97	49-66
MW. Zeit bis DM pos. (in Tg.)	82	79	97	58

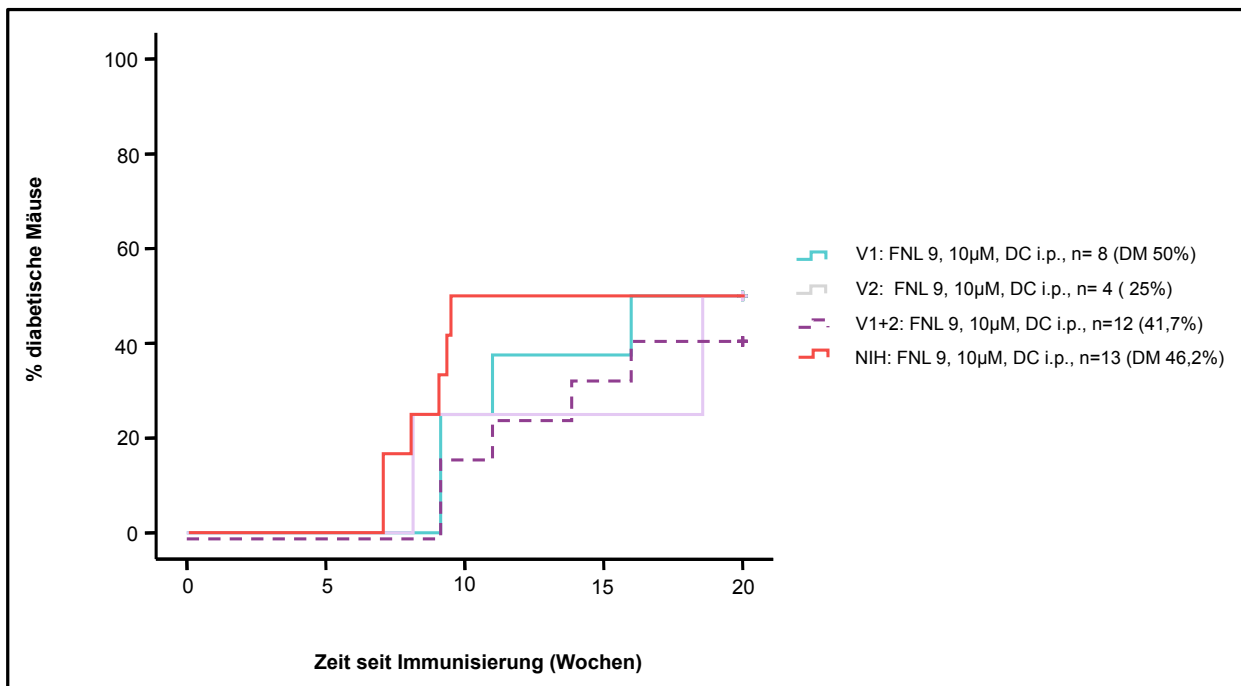


Abbildung 3.5: Zellimmunisierung FNL 9: HMGU Versuch 1+2 gesamt (V1+V2) vs. Versuch 1 (V1) vs. Versuch 2 (V2) vs. NIH

3.1.11 Zellimmunisierung mit den potentiell diabetogenen Peptiden: IGRP 241-249 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2

Als weiteres als diabetogen beschriebenes Peptid wurde IGRP 241-249 untersucht. Es wurde in einer Konzentration von 10µM auf die BM-DC geladen und insgesamt 12 Mäusen [davon 8 (66,7%) männliche und 4 (33,3%) weibliche Tiere im Alter von 8,9 bis 18,4 (Mittelwert 12,6) Wochen] appliziert.

Im ersten Versuchsteil wurden 8 RIP-CD80+GP+ Mäuse [6 Männchen (75%), 2 Weibchen (25%)] im Alter von 8,9 bis 18,4 (Mittelwert: 13,2) Wochen immunisiert. Davon entwickelten 2 der 8 Versuchstiere (25%) innerhalb von 77 bis 130 (im Mittel nach 104) Tagen Diabetes. Es waren nur männliche Mäuse betroffen, sodass die Diabetesrate der Männchen in diesem Teilversuch bei 33,3% (2 von 6 männlichen Mäusen) und bei den Weibchen bei 0% (0 der 2 weiblichen Mäuse) lag.

Im zweiten Experiment wurden 4 Tiere [2 Männchen (50%), 2 Weibchen (50%)] im

Alter von 11.7 bis 12 (Mittelwert: 11.9) Wochen behandelt. Ein männliches Tier entwickelte nach 57 Tagen eine diabetische Stoffwechsellaage (25%). Die Rate der diabetischen Männchen war bei 50% (1 von 2 männlichen Tieren), die der Weibchen wie im ersten Versuchsteil bei 0% (0 von 2 Weibchen). Betrachtet man die Ergebnisse der beiden Versuchsteile gemeinsam, so entwickelten 25% der RIP-CD80+GP+ Mäuse nach durchschnittlich 81 Tagen (Zeitspanne: 57-130 Tage) Diabetes. Die Diabetesrate der einzelnen Versuche lag ebenfalls bei jeweils 25%. In beiden Versuchsteilen erkrankte keine der weiblichen Mäuse an Diabetes. Die Diabetesrate der männlichen Tiere lag insgesamt bei 37.5% (3 der 8 Männchen erkrankten, s. Abb. 3.13). Die Zeitspanne bis zum Auftreten von diabetischen Glukosewerten war mit durchschnittlich 104 Tagen im ersten Versuch im Vergleich zu 57 Tagen im zweiten Experiment deutlich different (s. Tab. 3.5, Abb. 3.6). Insgesamt ließ sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Diabetesrate ($p=0.462$) der Ergebnisse der beiden Versuchsgruppen aufweisen. Unter Verwendung des Epitops IGRP 241-249 war es möglich, Diabetes bei den RIP-CD80+GP+ Mäusen zu induzieren, wenn auch signifikant weniger effektiv als bei den Positivkontrollen LCMV-GP 33-41 (Diabetesrate: 100%, $p<0.001$) und LCMV-GP 276-286 (Diabetesrate: 91.7%, $p<0.001$). Kein signifikanter Unterschied in der Diabetesrate zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle LCMV-NP 396-404 ($p=0.898$).

3.1.12 IGRP 241-249: HMGU, Versuch 1+2 gesamt vs. NIH

Am NIH wurden insgesamt 5 weibliche Tiere (= 100% Weibchen) mit 10 μ M IGRP 241-249 beladenen BM-DC immunisiert. Damit differierte die Verteilung der NIH-Kohorte von der am HMGU mit insgesamt 12 Tieren und 66.7% Männchen sowie 33.3% Weibchen. Mit einem Altersdurchschnitt von 11.4 Wochen bei Immunisierung am NIH und 12.6 Wochen am HMGU zeigte dieser Parameter ähnliche Werte, wenn auch der absolute Altersrange am HMGU weiter gefasst war (8.9 bis 18.4 Wochen) als am NIH (Altersrange 7.1-15 Wochen). Aussagen zu Geschlechterpräferenzen im örtlichen Vergleich konnten nicht gemacht werden, da die Versuchsgruppe am NIH ausschließlich aus weiblichen Tieren bestand (s. Abb. 3.13). Die erzielte Diabetesrate war vergleichbar zu der am HMGU. Am NIH wurden 20% (1 der 5 Versuchstiere, jedoch erst nach 158 Tagen, s.u.), am HMGU insgesamt 25% der Versuchsgruppe diabetisch. Jedoch entwickelten die Mäuse am HMGU mit durchschnittlich 81 Tagen im Vergleich deutlich

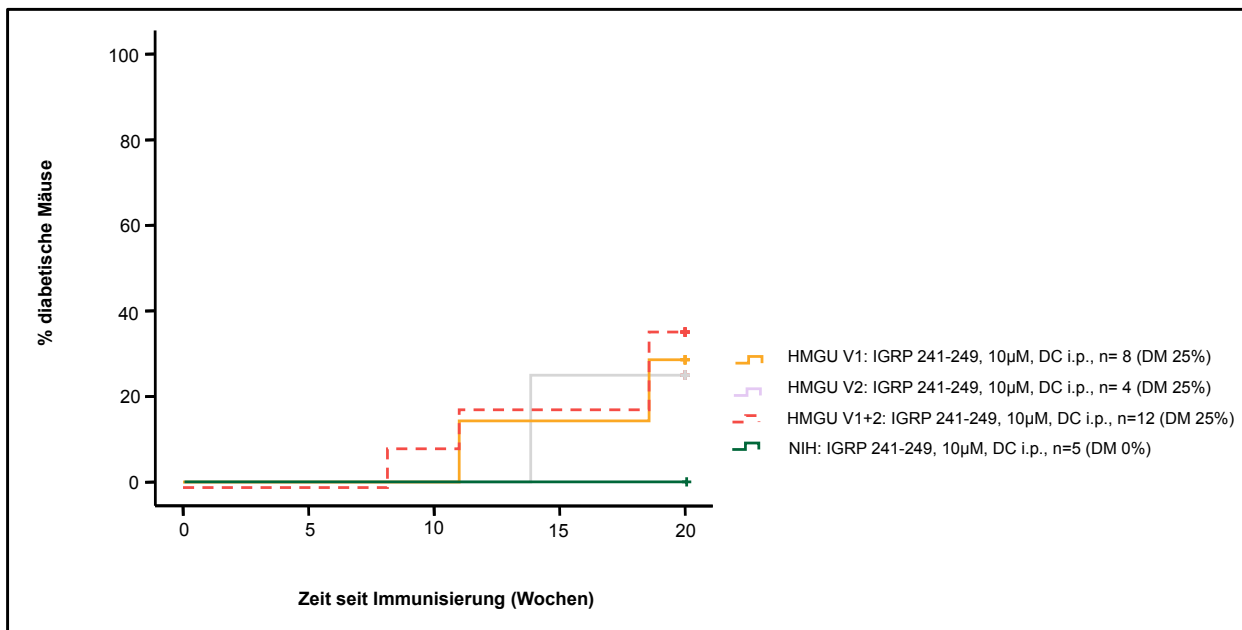


Abbildung 3.6: Zellimmunisationen IGRP 241-249: HMGU Versuch 1+2 gesamt (V1+V2) vs. Versuch 1 (V1) vs. Versuch 2 (V2) vs. NIH

schneller eine diabetische Stoffwechsellage als das Versuchstier am NIH mit 158 Tagen (s. Tab. 3.5). In unserem Versuchssetting mit Versuchsende bei Erreichen von 20 Lebenswochen wäre die diabetische Maus des NIH mit Diabetesbeginn nach erst 158 Tagen bereits zuvor aus dem Versuch ausgeschieden und wäre dementsprechend nicht in die Liste der Diabetes-positiven Tiere aufgenommen worden. Aus unserer Sicht läge demnach die Diabetesrate am NIH bei 0%. Dies ist auch so in Abb. 3.6 aufgezeigt.

3.1.13 Zellimmunisationen mit den potentiell diabetogenen Peptiden: mIGRP 225-233 HMGU, Versuch 1+2 gesamt / Versuch 1 vs. 2

Das dritte untersuchte Peptid, dem Diabetogenität in der Literatur zugesprochen wurde, war das Epitop mIGRP 225-233. Mit 10µM beladenen BM-DC wurden folglich 12 Versuchstiere [davon 9 (75%) männliche und 3 (25%) weibliche Mäuse im Alter von 8.9 bis 15.9 (Mittelwert 12.2) Wochen] immunisiert.

8 RIP-CD80+GP+ Mäuse [6 Männchen (75%), 2 Weibchen (25%)] im Alter von 8.9 bis 15.9 (Mittelwert: 13.1) Wochen wurden in die Versuchsgruppe des ersten Experiments

Tabelle 3.5: Zellimmunisierungen: IGRP 241-249

Peptid: IGRP 241-249	HMGU gesamt	HMGU Versuch 1	HMGU Versuch 2	NIH gesamt
Tierzahl gesamt	12	8	4	5
- davon ♂	8 (66.7%)	6 (75%)	2 (50%)	0 (0%)
- davon ♀	4 (33.3%)	2 (25%)	2 (50%)	5 (100%)
Altersrange (in Wochen)	8.9-18.4	8.9-18.4	11.7-12.0	7.1-15.0
MW. Alter (in Wochen)	12.6	13.2	11.9	11.4
Diabetesrate gesamt	3/12 (25%)	2/8 (25%)	1/4 (25%)	1/5 (20%)
- davon ♂	3/3 (100%)	2/2 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)
- davon ♀	0/3 (0%)	0/2 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
Diabetesrate ♂	3/8 (37.5%)	2/6 (33.3%)	1/2 (50%)	0/0 (0%)
Diabetesrate ♀	0/4 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	1/5 (20%)
Altersrange bei Imm. (in Wo.)	12.0-15.4	12.1-15.4	12	7.1
MW. Alter bei Imm. (in Wo.)	12.8	13.6	12	7.1
Zeit bis DM pos. (in Tg.)	57-130	77-130	57	158
MW. Zeit bis DM pos. (in Tg.)	81	104	57	158

eingeschlossen. Davon entwickelten 6 der 8 Versuchstiere (75%) innerhalb von 7 bis 112 (im Mittel nach 78) Tagen Diabetes. Die Diabetesrate lag für die männlichen Tiere bei 75% (4 von 6 Mäusen) und bei 100% für die weiblichen Tiere (2 von 2 Mäusen). Im zweiten Versuchsteil wurden 4 Tiere [3 Männchen (75%), 1 Weibchen (25%)] im Alter von 9.9 bis 12 (Mittelwert: 11.3) Wochen verwendet. Ein männliches Tier (Diabetesrate Männchen: 33.3%) sowie eine weibliche Maus (Diabetesrate Weibchen: 100%) entwickelten nach 49 bzw. 102 (Mittelwert: 76) Tagen eine diabetische Stoffwechsellaage. Damit lag die Diabetesrate des gesamten zweiten Experiments bei 50% (s. Tab. 3.6). Insgesamt ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0.485$) zwischen den Ergebnissen bzgl. der Diabetesinduktion der beiden Versuchsgruppen ausmachen. Betrachtet man die Ergebnisse beider Versuche zusammen, so entwickelten 66.7% (8 von 12 Tieren) Mäuse nach durchschnittlich 77 Tagen (Zeitspanne: 7-112 Tage) Diabetes, davon 55.6% (5 von 9) der Männchen und 100% (3 von 3) der Weibchen (s. Abb. 3.14). Auffällig war die breite Zeitspanne der Diabetesmanifestation - eine Maus war bereits nach 7 Tagen diabetisch, eine andere jedoch erst nach 112 Tagen (s. Abb. 3.7). Mit einer Diabetesrate von 66.7% war das Peptid mIGRP 225-233 das effektivste unter den in der Literatur als potentiell diabetogen beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Epitopen. FNL 9 induzierte bei 41.7% der Mäuse Diabetes und IGRP 241-249 bei 25%. Damit war mIGRP 225-233 das potenteste der in unserer Versuchsreihe untersuchten Peptide, wenn auch keine signifikant höhere Diabetesrate im Vergleich zu den o.g. Peptiden nachweisbar war [$p=0.247$ (FNL 9); $p=0.110$ (IGRP 241-249)]. Auch die Zeitspanne bis zum Auftreten von Diabetes war geringfügig kürzer unter Verwendung von mIGRP 225-233 (im Durchschnitt 77 Tage) im Vergleich zu durchschnittlich 82 Tagen bei FNL 9 und 81 Tagen bei IGRP 241-249. Die Positivkontrollen LCMV-GP 33-41 ($p<0.001$) und LCMV-GP 276-286 ($p=0.006$) zeigten eine signifikant höhere Diabetesrate verglichen mit mIGRP 225-233. Gegenüber der Negativkontrolle LCMV-NP 396-404 konnte mIGRP 225-233 signifikant häufiger Diabetes auslösen ($p<0.05$).

3.1.14 mIGRP 225-233: HMGU, Versuch 1+2 vs. NIH

Am NIH wurden insgesamt 9 Tiere in die Versuchsgruppe eingeschlossen und mit $10\mu\text{M}$ mIGRP 225-233 beladenen BM-DC immunisiert. Von den 9 Mäusen waren 5 Tiere

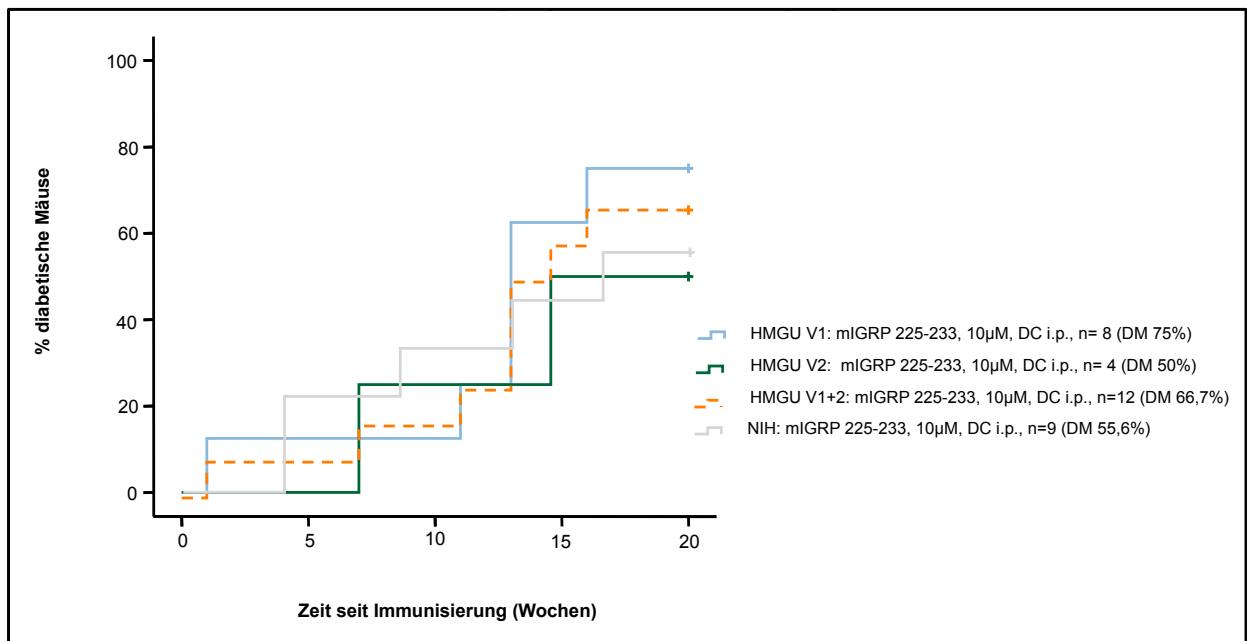


Abbildung 3.7: Zellimmunisierungen mIGRP 225-233: HMGU Versuch 1+2 gesamt (V1+V2) vs. Versuch 1 (V1) vs. Versuch 2 (V2) vs. NIH

männlich (55.6%) und 4 weiblich (44.4%). Mit einem Altersdurchschnitt von 8.3 Wochen bei Immunisierung waren die Versuchstiere am NIH etwas jünger als am HMGU mit einem durchschnittlichen Alter von 12.2 Wochen. Die Diabetesrate am NIH betrug insgesamt 55.6% (5 der 9 Tiere erkrankten). Für die Männchen lag sie bei 80% (4 der 5 männlichen Tiere entwickelten Diabetes) und für die Weibchen bei 25% (1 von 4 weiblichen Mäusen erkrankte). Damit verhielt sich die Geschlechterverteilung gegensätzlich zu den am HMGU erzielten Resultaten. Hier wurden 100% der Weibchen und 55.6% der Männchen diabetisch. Folglich zeigten sich in diesem Versuch keine Geschlechterpräferenzen bezüglich der Diabetesmanifestation (s. Abb. 3.14). Die Tiere wurden am NIH innerhalb von 28 bis 116 (durchschnittlich 65) Tagen diabetisch, dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen am HMGU. Dort erkrankten die Mäuse nach 7-112 (im Durchschnitt 77) Tagen (s. Tab. 3.6, Abb. 3.7). Auch bei den Versuchen mit dem Peptid mIGRP 225-233 zeigte sich die Möglichkeit der Wiederholbarkeit und das Erreichen von ähnlichen Resultaten in den Versuchen, unabhängig von Ort und Zeit.

Tabelle 3.6: Zellimmunisierungen: mIGRP 225-233

Peptid: mIGRP 225-233	HMGU gesamt	HMGU Versuch 1	HMGU Versuch 2	NIH gesamt
Tierzahl gesamt	12	8	4	9
- davon ♂	9 (75%)	6 (75%)	3 (75%)	5 (55.6%)
- davon ♀	3 (25%)	2 (25%)	1 (25%)	4 (44.4%)
Altersrange (in Wochen)	8.9-15.9	8.9-15.9	9.9-12.0	6.0-10.3
MW. Alter (in Wochen)	12.2	13.1	11.3	8.3
Diabetesrate gesamt	8/12 (66.7%)	6/8 (75%)	2/4 (50%)	5/9 (55.6%)
- davon ♂	5/8 (62.5%)	4/6 (66.7%)	1/2 (50%)	4/5 (80%)
- davon ♀	3/8 (37.5%)	2/6 (33.3%)	1/2 (50%)	1/5 (20%)
Diabetesrate ♂	5/9 (55.6%)	4/6 (75%)	1/3 (33.3%)	4/5 (80%)
Diabetesrate ♀	3/3 (100%)	2/2 (100%)	1/1 (100%)	1/4 (25%)
Altersrange bei Imm. (in Wo.)	8.9-15.9	8.9-15.9	11.7-12.0	6.0-10.1
MW. Alter bei Imm. (in Wo.)	12.6	13.4	11.9	9
Zeit bis DM pos. (in Tg.)	7-112	7-112	49-102	28-116
MW. Zeit bis DM pos. (in Tg.)	77	78	76	65

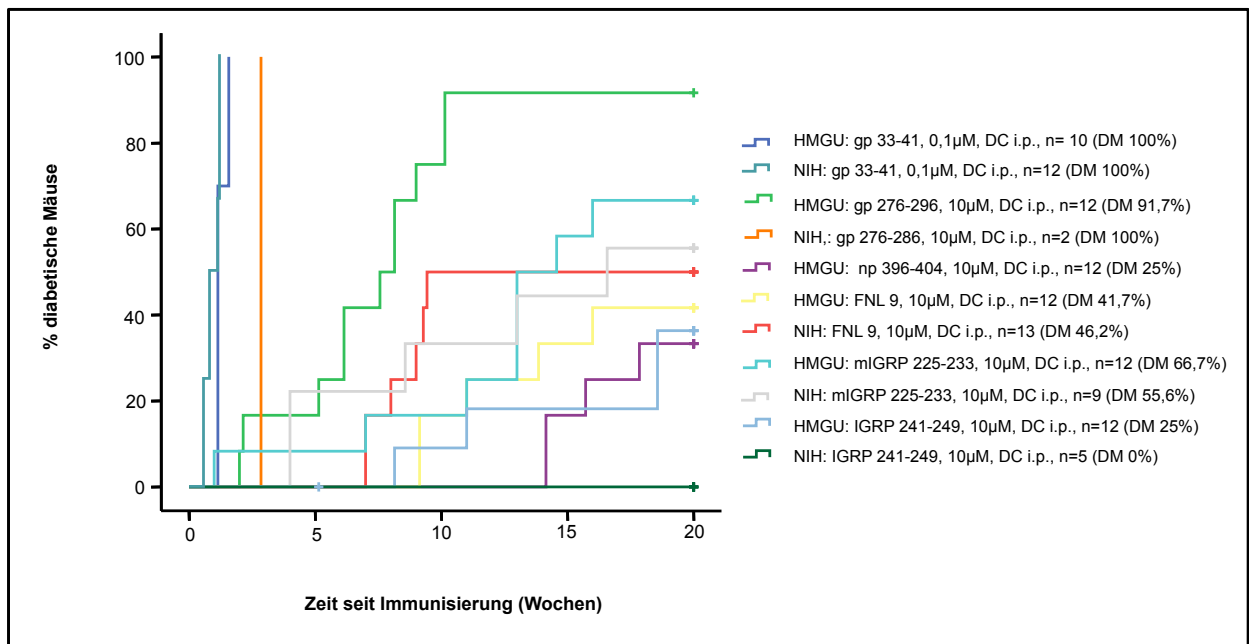


Abbildung 3.8: Zellimmunisierungen HMGU Versuch 1+2 gesamt vs. NIH

3.1.15 Diabetesraten bezogen auf die Geschlechter- und Altersverteilung: HMGU vs. NIH

Insgesamt wurden 70 Versuchstiere für die Zellimmunisierungen am HMGU und 41 Mäuse am NIH untersucht. 70% der Tiere am HMGU waren männlich und 30% weiblich. Die Geschlechterverteilung war mit 53.40% Männchen und 46.6% Weibchen am NIH ausgewogener. Die Diabetesrate lag für die männlichen Tiere am HMGU bei 63.3%, die der weiblichen Mäuse mit 70% etwas höher. Verglichen mit den Raten am NIH zeigte sich eine umgekehrte Geschlechterverteilung. Dort erkrankten mit 76.3% mehr Männchen als Weibchen- diese wurden in 56.3% der Fälle diabetisch. Damit ließ sich zwar feststellen, dass am HMGU bevorzugt weibliche und am NIH bevorzugt männliche Tiere nach Immunisierung Diabetes entwickelten. Ein eindeutiger Trend zur geschlechtsspezifischen Diabetesinduktion war hieraus jedoch nicht abzuleiten (s. Tab. 3.7, Abb. 3.9-3.14). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die Diabetesentwicklung geschlechtsunabhängig ist. Im Durchschnitt waren die verwendeten Mäuse am HMGU bei Immunisierung 1.4 Wochen älter als die Versuchstiere am NIH. Mit insgesamt ähnlichen Raten an diabetischen Tieren (HMGU: 65.0% versus NIH: 64.4%)

Tabelle 3.7: Diabetesraten bezogen auf die Geschlechter- und Altersverteilung

	HMGU	NIH
Anzahl aller Versuchstiere	70	41
Altersdurchschnitt aller Versuchstiere (Wo) bei Immun.	12	10.6
Diabetesrate gesamt (%)	65%	64.4%
Männchen (♂)	70%	53.4%
Diabetesrate (%)	63.3%	76.3%
Weibchen (♀)	30%	46.6%
Diabetesrate (%)	70%	56.3%

ließ sich feststellen, dass eine geringe Varianz des Alters der Mäuse bei Immunisierung keinen Einfluss auf die Diabetessuszeptibilität hatte (s. Tab. 3.7).

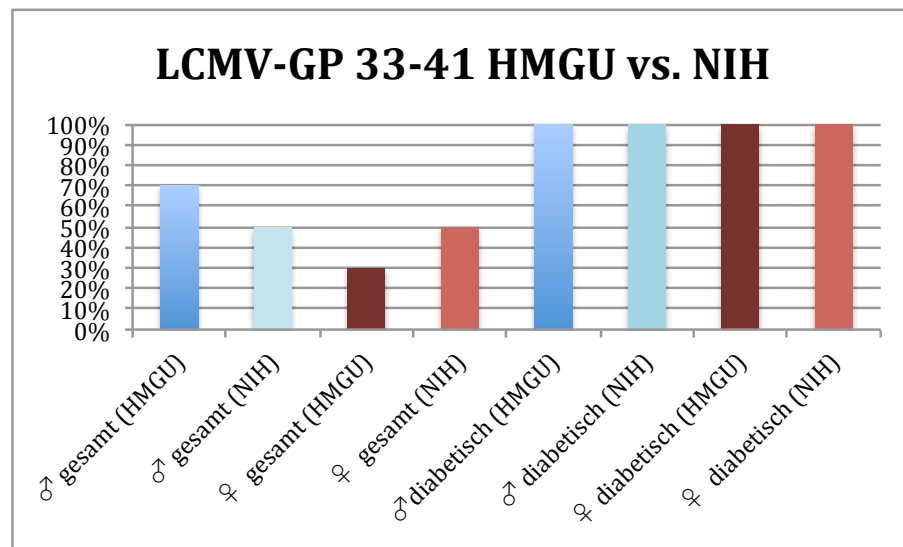


Abbildung 3.9: Geschlechtsbezogene Diabetesrate: Zellimmunisierungen LCMV-GP 33-41 HMGU vs. NIH

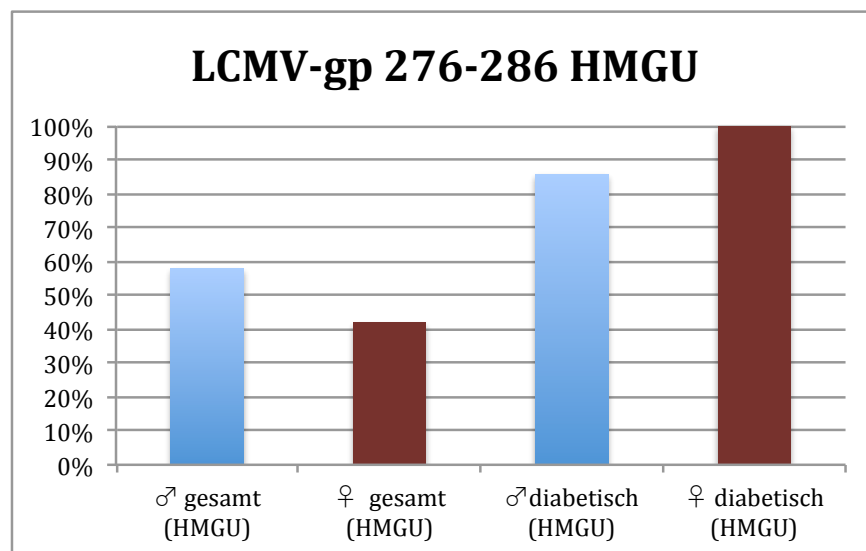


Abbildung 3.10: Geschlechtsbezogene Diabetesrate: Zellimmunisierungen LCMV-GP 276-286 HMGU

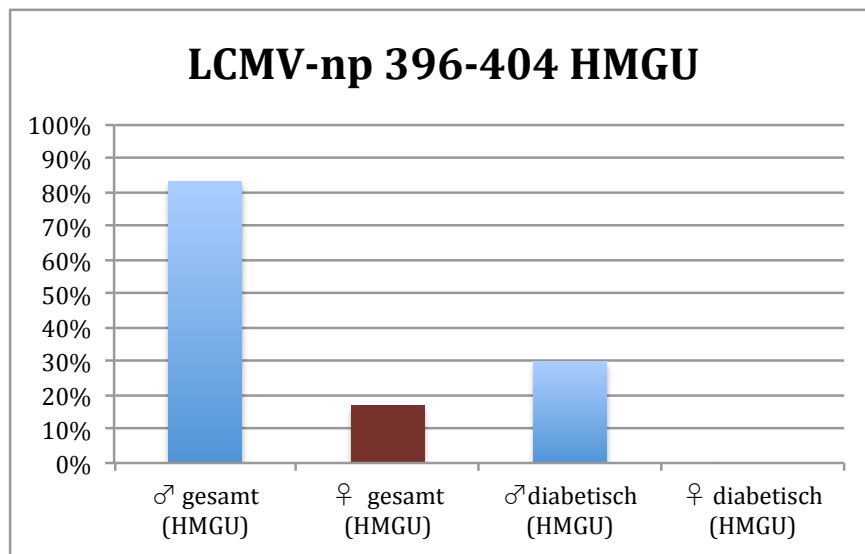


Abbildung 3.11: Geschlechtsbezogene Diabetesrate: Zellimmunisationen LCMV-NP 396-404 HMGU

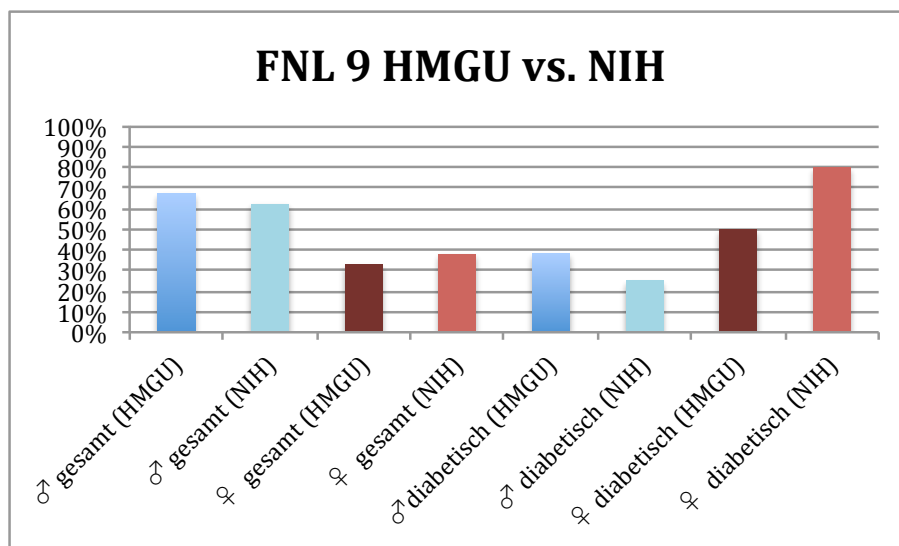


Abbildung 3.12: Geschlechtsbezogene Diabetesrate: Zellimmunisationen FNL 9 HMGU vs. NIH

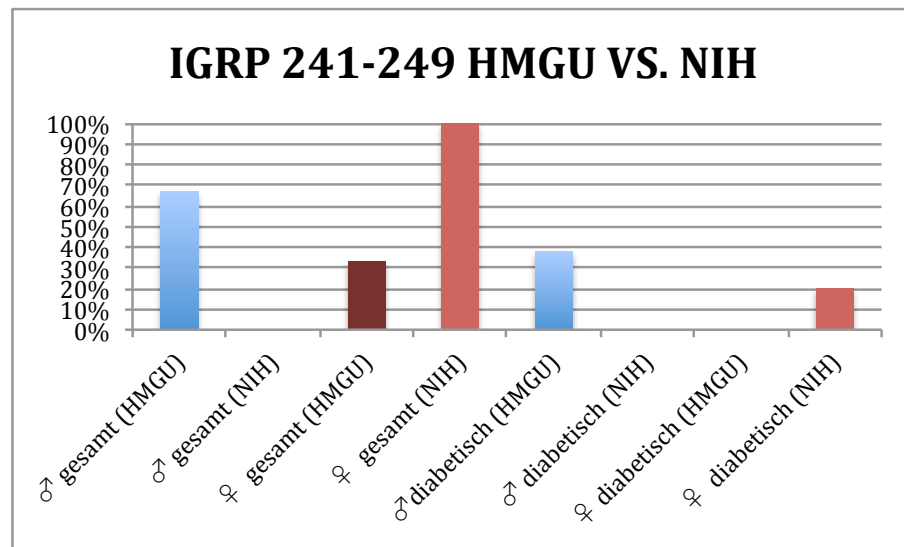


Abbildung 3.13: Geschlechtsbezogene Diabetesrate: Zellimmunisierungen IGRP 241-249 HMGU VS. NIH

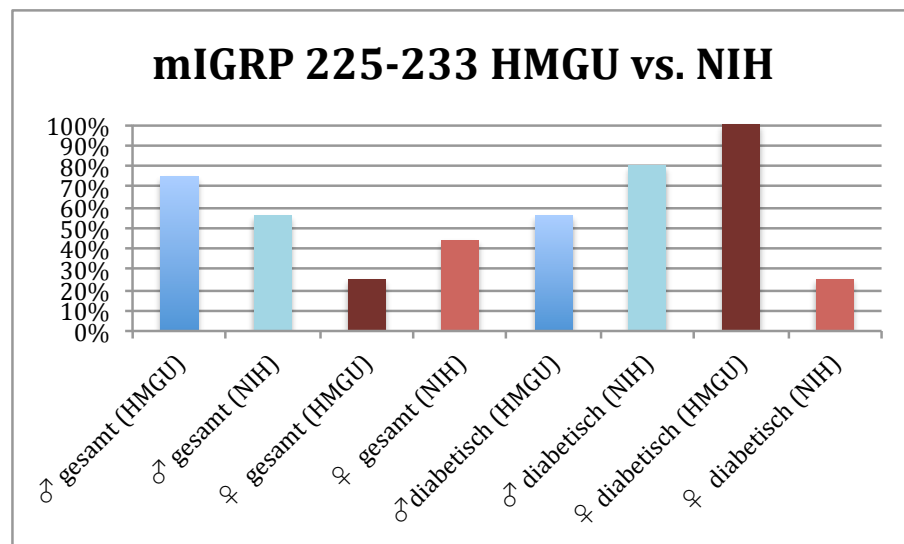


Abbildung 3.14: Geschlechtsbezogene Diabetesrate: Zellimmunisierungen mIGRP 225-233 HMGU vs. NIH

3.2 Analyse alternativer Peptidapplikationsmethoden: Optimierung des Zeitbedarfs für die CD8+ T-Zell- verifikationen

Obwohl die Diabetesinduktion mittels Peptid/BM-DC-Transfer zuverlässig funktioniert, ist die Gewinnung der BM-DC und die Nachverfolgung der Mäuse bis zur Diabetesentstehung sehr zeitaufwändig. Daher wurden 3 Pilotstudien gestartet, um zu prüfen, ob andere Peptidapplikationsmethoden ebenfalls Diabetes in RIP-CD80+GP+ Mäusen auslösen können und weniger zeitaufwändig sind. Eine direkte Applikation der Peptide in PBS bzw. in Kombination mit einem Adjuvans (Imject Alum, Pierce) sollte dabei die Zeit für die BM-DC Kultivierung einsparen und eine entsprechend hohe Konzentration an verabreichtem Peptid die Beobachtungszeit bis zur Diabetesmanifestation verkürzen. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob ohne die sehr sensitive Methode der spezifischen Zellimmunisationen mit BM-DC in den nun durchgeführten Versuchen mit Adressierung aller Immunzellen durch reine Peptidinjektionen ebenfalls effektiv Diabetes induziert werden konnte (s. Kap. 2.3.5).

Da es sich bei den Versuchen um Pilotstudien handelte, wurden die Versuchsgruppen zunächst auf 3 Tiere pro Telexperiment begrenzt. Sobald in einer der Behandlungsgruppen zuverlässig diabetische Tiere auftraten, wurden die Tierzahlen im entsprechenden Studienteil auf 6 Tiere erhöht, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Für die Versuche wurde ausschließlich das dominante Epitop LCMV-GP 33-41 des Positiv-Kontrollantigens LCMV-GP verwendet, welches bereits in geringer Konzentration (0.1 μ M) auf BM-DC geladen sehr effizient und zeitnah Diabetes in RIP-CD80+GP+ Mäusen auslöste (Diabetesrate 100%). Somit war die Diabetogenität des LCMV-GP 33-41 mittels Zellimmunisationen *in vivo* bewiesen. Es wurden wie bei den Zellimmunisationen adulte Mäuse im Alter von 9 bis 24 Wochen verwendet, die behandelten Mäuse wurden bis zu 20 Wochen nach der Peptidapplikation bzw. zur Diabetesmanifestation nachverfolgt (s. Kap. 2.1.7, Kap. 2.1.8).

Im ersten Telexperiment wurde LCMV-GP 33-41 in 3 verschiedenen Konzentrationen (50, 100 und 150 μ g) je 3 Mäusen in das abdominale Fettgewebe subkutan appliziert. Die 3 mit 50 μ g Peptid immunisierten Versuchstiere (2 Männchen, 1 Weibchen) waren

bei Immunisierung zwischen 20.1 und 24 Wochen alt (Altersdurchschnitt: 22.7 Wochen). Keine der Mäuse entwickelte im Beobachtungszeitraum von 20 Wochen post Immunisierung Diabetes. Damit lag die Diabetesrate in diesem Versuchsteil bei 0%.

Eine der 3 mit 100µg LCMV-GP 33-41 beimpften Mäuse entwickelte nach 99 Tagen eine diabetische Stoffwechsellage. Bei diesem Versuchstier handelte es sich um ein bei Immunisierung 24 Wochen altes Weibchen. Die beiden anderen Tiere der Versuchsgruppe (1 Männchen und 1 Weibchen im Alter von 20.1 Wochen bei Immunisierung) blieben Diabetes-negativ. Damit lag der Altersdurchschnitt in dieser Kohorte bei 21.4 Wochen zur Zeit der Immunisierung. Die Diabetesrate lag insgesamt bei 33.3%, für die weiblichen Tiere bei 50% (1 von 2 Weibchen) und für die männlichen Mäuse bei 0% (0 von 1 Männchen).

In der Versuchsgruppe der 3 mit 150µg Peptid immunisierten Mäuse (3 Weibchen im Alter von 20.1 bis 24 Wochen bei Immunisierung (im Durchschnitt: 22.7 Wochen) entwickelte keines der Tiere Diabetes, die Diabetesrate lag bei 0%.

Folglich ging die mit der geringsten Vorbereitungszeit verbundene Applikationsmethode der Peptide mit einer nicht ausreichend validen Diabetesinduktion [Diabetesrate gesamt: 11.1% (1 von 9 Mäusen)] und einer fehlenden Zeitoptimierung (Auftreten von Diabetes nach erst 99 Tagen) im Vergleich zur BM-DC Methode einher.

Im zweiten Telexperiment erfolgte die Immunisierung mit LCMV-GP 33-41 in Kombination mit dem Adjuvans Imject Alum (Pierce). Dazu wurden verschiedene Peptidkonzentrationen (50, 100 und 150µg) in einem Verhältnis von 1:1 mit Imject Alum vermischt und den Tieren subkutan im Bauchbereich appliziert.

Eine der 3 mit 50µg Peptid und Imject Alum immunisierten Mäuse (männlich, Alter: 13.9 Wochen bei Immunisierung) zeigte nach 101 Tagen diabetische Glukosewerte. Die anderen beiden Versuchstiere (1 Männchen und 1 Weibchen im Alter von 10.4 und 13.9 Wochen zum Zeitpunkt der Immunisierung) blieben nicht-diabetisch. Die Diabetesrate insgesamt betrug 33.3%, für die Männchen lag sie bei 50% und für die Weibchen bei 0%. Aufgrund der langen Zeitspanne bis zum Auftreten von Diabetes und insgesamt nur einer diabetischen Maus wurde dieser Versuchsabschnitt nicht auf eine Kohortengröße von 6 Tieren erweitert.

Unter subkutaner Applikation von 100µg LCMV-GP 33-41 mit Imject Alum konnte bei den ersten 3 Versuchstieren erfolgreich Diabetes induziert werden, sodass die Gruppe

auf insgesamt 6 Tiere erweitert wurde. Sie bestand damit insgesamt aus 3 Männchen und 3 Weibchen im Alter von 9.4 bis 13.9 (im Durchschnitt: 10.3 Wochen) bei Immunisierung. Unter den diabetischen Tieren waren 2 Männchen (66.7%) und 1 Weibchen (33.3%). Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Immunisierung betrug 11.1 Wochen. Die drei weiteren zu einem zweiten Zeitpunkt immunisierten Mäuse wurden nicht diabetisch, jedoch musste eines der Tiere aufgrund von anderweitiger Krankheit nach 48 Tagen aus dem Versuch genommen werden. Die Versuchstiere entwickelten nach 45 bis 90 (Mittelwert: 64) Tagen eine diabetische Stoffwechsellage. Damit lag die Diabetesrate insgesamt bei 50% (respektive 60%, wenn die aus dem Versuch ausgeschiedene kranke Maus nicht einbezogen wurde), bei den männlichen Tieren bei 66.7% (respektive 100%, sofern das aus dem Versuch ausgeschiedene Tier nicht in diese Statistik einging) und bei den weiblichen Tieren bei 33.3%.

Durch subkutane Immunisierung mit 150 μ g Peptid in Kombination mit Alum-Adjuvans entwickelten 2 der ersten 3 Versuchstiere [2 Männchen, 1 Weibchen im Alter von 9.0-13.9 (Mittelwert: 10.8 Wochen) bei Immunisierung] nach 73 und 122 Tagen Diabetes. Dabei handelte es sich um die 2 männlichen Tiere im Alter von 13.9 und 9 Wochen zum Zeitpunkt der Immunisierung. Damit lag die Diabetesrate in diesem Teil bei 100% für die Männchen und 0% für die Weibchen. Daraufhin wurde die Versuchskohorte auf 6 Tiere aufgestockt. Von den 3 Mäusen des zweiten Experimentteils entwickelten wiederum 2 Versuchstiere nach 66 und 48 Tagen Diabetes, je ein Männchen und ein Weibchen im Alter von 9.4 Wochen bei Immunisierung. Die dritte Maus (weiblich) musste aufgrund von anderweitiger Krankheit nach 84 Tagen aus dem Versuch ausscheiden. Insgesamt bestand die Versuchsgruppe also aus 6 Mäusen mit je 3 männlichen und 3 weiblichen Tieren im Alter von 9.0 bis 13.9 (Mittelwert: 10.8) Wochen zum Zeitpunkt der Peptidinjektion. 4 der 6 Mäuse zeigten nach durchschnittlich 77 Tagen diabetische Glukosewerte. Die Diabetesrate insgesamt lag bei 66.7% (sofern das aus dem Versuch ausgeschiedene kranke Tier nicht einbezogen wurde bei 80%). Von den diabetischen Mäusen waren 3 männlich, die Diabetesrate für Männchen betrug damit 100%, und 1 weiblich, die Diabetesrate betrug 33.3% (zählte man die kranke, aus dem Versuch genommene weibliche Maus nicht mit, so lag die Diabetesrate für Weibchen bei 50%).

In einem dritten Versuchsteil wurde geprüft, ob mittels intraperitonealer Applikation der LCMV-GP 33-41/Adjuvans-Lösung bessere Ergebnisse in der Diabetesinduktion

erzielt werden konnten, da möglicherweise mehr Immunzellen durch intraperitoneale Immunisierung adressiert werden. Auch hier wurde das Peptid in den 3 verschiedenen Konzentrationen (50, 100, 150 μ g) verwendet. Die einzelnen Kohorten bestanden aus je 3 Mäusen, davon waren alle männlichen Geschlechts und zwischen 17.3 und 18.1 (im Durchschnitt: 17.7) Wochen bei Immunisierung alt. Aus der Gruppe der mit 50 μ g Peptid immunisierten Mäuse entwickelte ein Männchen (18.1 Wochen alt bei Immunisierung) nach 85 Tagen Diabetes. Die beiden anderen Tiere (17.3 und 18.1 Wochen alt bei Immunisierung) blieben Diabetes-negativ. Die Diabetesrate insgesamt lag damit bei 33.3%, auf das männliche Geschlecht bezogen ebenfalls bei 33.3%. Aufgrund fehlender weiblicher Versuchstiere konnte keine Diabetesrate für weibliche Tiere erhoben werden.

Mittels Applikation von LCMV-GP 33-41/Alum i.p. in einer Konzentration von 100 μ g konnte ebenfalls bei einer von 3 Mäusen (Durchschnittsalter: 17.6 Wochen bei Immunisierung) Diabetes induziert werden. Es handelte sich um ein Männchen im Alter von 17.3 Wochen zum Zeitpunkt der Peptidinjektion, welches nach 107 Tagen diabetisch wurde. Die Diabetesrate gesamt und bezogen auf männliche Tiere lag bei 33.3%.

Im letzten Teilabschnitt der Versuche wurde das Peptid/Alum i.p. in einer Konzentration von 150 μ g verwendet. Hier entwickelte keine der 3 Versuchsmäuse (männlich, Durchschnittsalter: 17.6 Wochen bei Immunisierung) eine diabetische Stoffwechsellaage.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der alternativen Applikationsmethoden in Tab. 3.8 und Abb. 3.15 dargestellt.

Auch bei den Peptidimmunisierungen in Kombination mit Adjuvants wurde keine Optimierung der Versuche im Vergleich zu den Immunisierungen mit Peptid-beladenen dendritischen Zellen erreicht. Die erzielten Diabetesraten waren unter Verwendung der verschiedenen Peptid-Adjuvanslösungen und der unterschiedlichen Applikationsmethoden (s.c. versus i.p.) zu geringfügig. Die intraperitoneale Immunisierung mit 150 μ g LCMV-GP 33-41/Alum löste bei keinem der Versuchstiere Diabetes aus. Unter Verwendung von 50 μ g Peptid/Alum subkutan bzw. intraperitoneal oder 100 μ g Peptid/Alum intraperitoneal konnte eine Diabetesrate von 33.3% erreicht werden. Hier zeigten die Mäuse jedoch erst nach 85-107 Tagen diabetische Glukosewerte, was dementsprechend keine Zeitoptimierung der Experimente bedeutete. Lediglich bei subkutaner Applikation von 100 μ g bzw. 150 μ g LCMV-GP 33-41/Alum konnte bei den RIP-CD80+GP+ Mäusen zu-

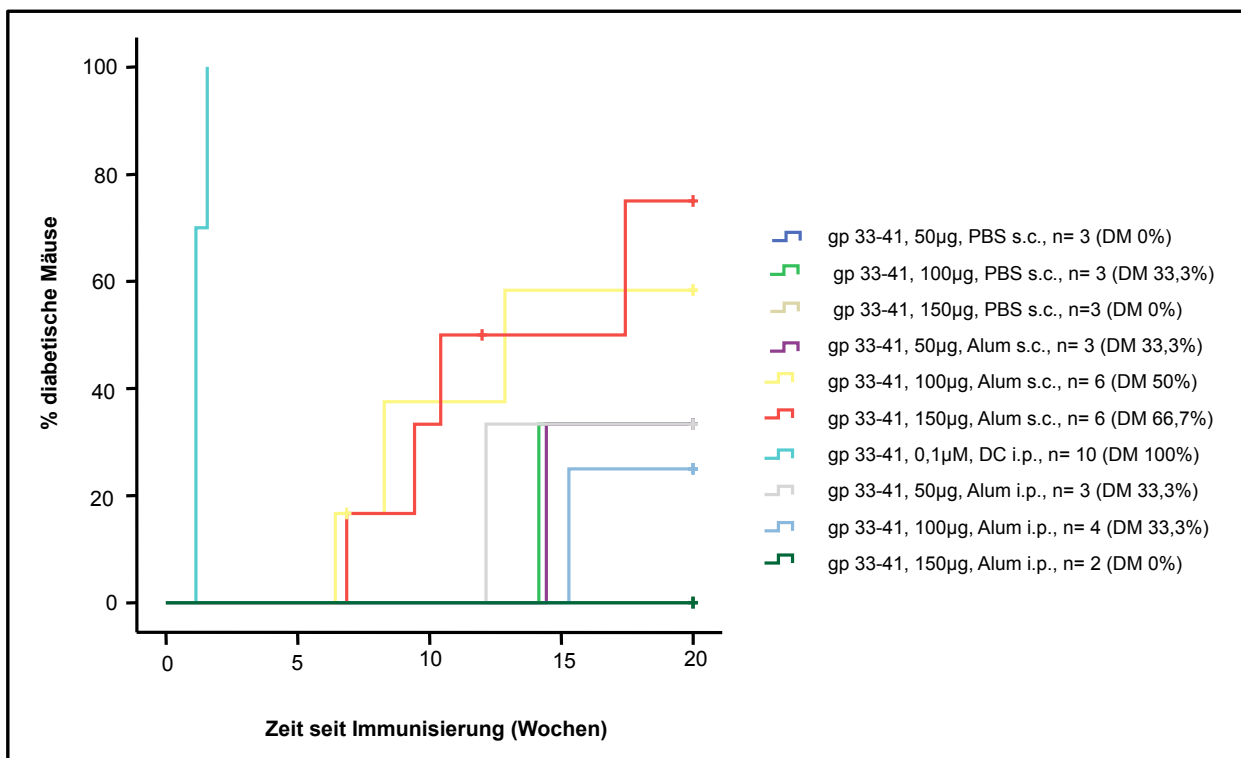


Abbildung 3.15: Alternative Applikationsmethoden: Peptidimmunisierungen mit LCMV-GP 33-41 (HMGU)

Tabelle 3.8: Alternative Applikationsmethoden: Peptidimmunisationen mit LCMV-GP 33-41 (HMGU)

LCMV-GP 33-41	50µg	100µg	150µg	50µg	100µg	150µg	50µg	100µg	150µg
Trägerlösungen	PBS	PBS	PBS	Alum	Alum	Alum	Alum	Alum	Alum
Applikationen	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	i.p.	i.p.	i.p.
Anzahl Mäuse	3	3	3	3	6	6	3	3	3
- davon ♂	2	1	0	2	3	3	3	3	3
- davon ♀	1	2	3	1	3	3	0	0	0
Alter	20.1- 24.0	20.1- 24.0	20.1- 24.0	10.4- 13.9	9.4- 13.9	9.0- 13.9	17.3- 18.1	17.3- 18.1	17.3- 18.1
MW. Alter	22.7	21.4	22.7	12.7	10.3	10.8	17.8	17.6	17.6
Anzahl DM pos.	0	1	0	1	3	4	1	1	0
DM. Rate	0%	33.3%	0%	33.3%	50%	66.7%	33.0%	33.3%	0%
- Rate ♂	/	0%	/	50%	66.7%	100%	33.3%	33.3%	/
- Rate ♀	/	50%	/	0%	33.3%	33.3%	/	/	/
Zeit bis DM. pos.	/	99	/	101	45-90	48-122	85	107	/
MW. bis DM. pos.	/	99	/	101	64	77	85	107	/

verlässig Diabetes induziert werden. Unter Benutzung des Peptids in der Konzentration von 100µg zeigten 50% (respektive 60%, wenn die aus dem Versuch ausgeschiedene, anderweitig erkrankte Maus nicht mitgezählt wurde) der Versuchstiere nach 45 bis 90 (im Durchschnitt: 64) Tagen eine diabetische Stoffwechsellaage. Die subkutanen Immunisationen mit 150µg Peptid/Alum führten innerhalb von 48 bis 122 (im Durchschnitt: 77) Tagen zu einer Diabetesrate von insgesamt 66.7% (sofern das aus dem Versuch ausgeschiedene kranke Tier nicht einbezogen wurde bei 80%).

3.3 Ergebnisse der Genotypisierung der RIP-CD80+GP+ Mäuse

3.3.1 Allgemeines

Um das Vorhandensein des CD80-Transgens auf den pankreatischen β -Zellen und die damit assoziierte Suszeptibilität für Autoantigen-induzierbaren Diabetes bei den RIP-

CD80+GP+ Mäusen nachzuweisen, wurde aus jedem Wurf der RIP-CD80+GP+ Versuchstiere die DNA je einer zufällig ausgewählten Maus diesbezüglich analysiert. Insgesamt wurden 19 RIP-CD80+GP+ Mäuse genotypisiert. Es konnte lediglich das Vorhandensein des CD80-Gens nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung, ob ein homo- oder heterozygoter Genotyp vorlag, war nicht möglich, jedoch in diesem Versuchskonzept auch nicht notwendig. Als Negativkontrolle für das CD80-Gen diente die zusätzlich isolierte DNA von 2 NOD-Mäusen, welche dieses Gen nicht trugen. Als PCR-Positivkontrolle diente das "MEN-Gen". Da dieses Gen bei jeder Maus vorlag, ergab folglich eine erfolgreiche PCR auch immer ein Produkt. Zur Beurteilung der nachweisbaren Banden wurde eine DNA-Referenz-Leiter (TrackIt 50bp DNA Ladder, Invitrogen) verwendet (s. Kap. 2.5).

Tabelle 3.9: Genotypisierung 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ladder	10	14	22	30	40	45	50	55	60	NOD	40	Ladder
mCD80 (642bp)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
MEN (159bp)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Anmerkung: Bei den Ziffern in der zweiten Zeile handelt es sich um die Identifikationsnummern der jeweiligen Versuchstiere. In Slot 6: Tasche ausgelaufen, daher nochmals in Tasche 12 pipettiert, um Ergebnis zu sichern.

Tabelle 3.10: Genotypisierung 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ladder	102	106	112	121	127	133	135	142	144	65	NOD	Ladder
mCD80 (642bp)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
MEN (159bp)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Anmerkung: Bei den Ziffern in der zweiten Zeile handelt es sich um die Identifikationsnummern der jeweiligen Versuchstiere.

3.3.2 Ergebnisse der Genotypisierung

In je zwei Versuchsteilen wurde die DNA der insgesamt 19 RIP-CD80+GP+ sowie der NOD Mäuse amplifiziert und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Bei allen Mäusen wurde das MEN-Gen bei 159 bp in der Gelelektrophorese nachgewiesen, was die erfolgreiche Durchführung der PCR anzeigte. Die amplifizierten DNA-Proben der NOD Mäuse, welche als Negativkontrolle für das CD80-Gen dienten, wiesen lediglich die MEN-Gen Bande auf. Bei allen Proben der RIP-CD80+GP+ Mäuse waren hingegen jeweils 2 Banden sichtbar: das MEN-Gen bei 159 bp und eine weitere Bande bei 642 bp, welche das Vorliegen des CD80-Gens bewies. Somit konnte der generelle Erfolg der PCR-Durchführung bzw. der DNA-Amplifikation bestätigt werden sowie die Spezifität des mCD80-Primers mit selektiver Amplifikation des CD80-Genprodukts. Da bei allen der genotypisierten RIP-CD80+GP+ Mäuse (je 1 zufällig ausgewählte Maus aus jedem Wurf) das Vorhandensein des CD80-Gens nachgewiesen werden konnte, wurde die genetisch kodierte Eigenschaft der erhöhten Suszeptibilität für Autoantigen-induzierbaren Diabetes verifiziert (s. Tab. 3.9 und 3.10).

3.4 Ergebnisse des Peptidbindungsverhaltens mittels FACS-Analyse

3.4.1 Allgemeines

In der Studie von Pechhold (Pechhold 2007) konnte gezeigt werden, dass die Diabetogenität von spezifischen Peptiden unter anderem von deren Bindungsaffinität an MHC-Klasse 1 Moleküle abhängt. Um dieses Verhalten an den von uns verwendeten Peptiden zu überprüfen, wurde mittels der humanen Lymphoblasten-Zelllinie "T2", deren Zellen die transgen murine MHC-Klasse 1 H-2Db Moleküle exprimieren, das Bindungsverhalten der jeweiligen Epitope an die MHC-Klasse 1 Moleküle untersucht. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden die Peptidkonzentrationen berechnet, die notwendig waren, um die MHC-Klasse 1 Moleküle um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluoreszenz zu stabilisieren. Es wurden die Bindungscharakteristika der einzelnen Peptide analysiert und ferner untersucht, ob die jeweilige Bindungsaffinität mit der *in*

vivo gemessenen Diabetesrelevanz korrelierte (s. Kap. 2.4). Darüber hinaus erfolgte ein Vergleich der Bindungseigenschaften der individuellen Peptide in Relation zueinander (s. Tab. 3.11).

Aufgrund von zwei gleichartig durchgeführten Messungen am HMGU zu zwei verschiedenen Zeitpunkten konnten die Ergebnisse auf ihre Wiederholbarkeit untersucht werden.

3.4.2 Ergebnisse der FACS-Analyse

Das Peptidbindungsverhalten an die MHC-Klasse 1 Rezeptoren wurde in zwei zeitlich von- einander unabhängigen Versuchen unter gleichartigem Versuchsaufbau analysiert. Es wurde untersucht, welche Peptidkonzentration notwendig war, um die MHC-Klasse 1 Rezeptoren der Zellen um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluoreszenz zu stabilisieren. Folgende Peptide wurden untersucht: LCMV-GP 276-286, mIGRP 225-233, IGRP 241-249 und FNL 9 (s. Kap. 2.4).

LCMV-GP 276-286

Bereits mit einer geringen Peptidkonzentration von im Mittel $14.5\mu\text{M}$ bei GP 276-286 war eine Stabilisierung der MHC-Klasse 1 Moleküle um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluoreszenz (= GEO mean) zu beobachten. Werden die Ergebnisse der beiden zeitlich voneinander unabhängigen Versuche verglichen (s. Tab. 3.11), so war mit $19\mu\text{M}$ im ersten Versuch (V1) eine höhere Peptidkonzentration im Vergleich zum zweiten Versuch (V2) notwendig. Im Vergleich zu dem Epitop GP 276-286 zeigte sich bei dem Peptid FNL 9 eine vergleichbar hohe Peptidkonzentration ($=14.5\mu\text{M}$) zur MHC-Stabilisierung. Bei mIGRP 224-233 und IGRP 241-249 waren deutlich höhere Konzentrationen ($44\mu\text{M}$ und $48\mu\text{M}$) nötig. Die Ergebnisse der *in vitro* Bindungsaffinität des Epitops GP 276-286 korrelierten hier mit der *in vivo* gemessenen hohen Diabetesrelevanz (Diabetesrate unter Verwendung von GP 276-286: 91.7%).

FNL 9

Auch bei dem Epitop FNL 9 erreichten bereits sehr geringe Peptidkonzentrationen (im Mittel ebenfalls $14.5\mu\text{M}$) eine MHC-Klasse 1 Molekül-Stabilisierung um das Doppel-

te der gemessenen Hintergrundfluoreszenz. Im Vergleich der beiden Versuche wurde im Versuch 1 eine höhere Peptidkonzentration ($20\mu\text{M}$) notwendig, um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluoreszenz zu messen, als im Versuch 2 ($9\mu\text{M}$). Verglichen mit den anderen Epitopen war die Bindungsaffinität bei dem Peptid GP 276-286 vergleichbar, hingegen bei mIGRP 225-233 und IGRP 241-249 deutlich niedriger (aufgrund von notwendigen höheren Peptidkonzentrationen von $44\mu\text{M}$ und $48\mu\text{M}$). Die *in vivo* gemessene Diabetesrate lag unter Verwendung des Epitops FNL 9 bei 41.7% und damit deutlich niedriger als bei GP 276-286 (91.7%). Trotzdem war die *in vitro* analysierte Bindungsaffinität dieser beiden Peptide an die MHC-Klasse 1 Moleküle gleich stark ausgeprägt.

mIGRP 225-233

Unter Verwendung von mIGRP 225-233 war im Durchschnitt $44\mu\text{M}$ Peptidlösung notwendig, um die MHC-Stabilisierung um das Doppelte der Hintergrundfluoreszenz zu erreichen. In beiden Versuchsteilen wurden ähnliche Peptidkonzentrationen benötigt (V1: $36\mu\text{M}$, V2: $52\mu\text{M}$). Im Vergleich mit den Epitopen GP 276-286 und FNL 9 zeigte sich eine deutlich niedrige Bindungsaffinität (also Verwendung einer höheren Peptidkonzentration), die Bindungsaffinität war IGRP 241-249 mit einer benötigten Peptidkonzentration von durchschnittlich $48\mu\text{M}$ vergleichbar. Den *in vitro* Ergebnissen gegenübergestellt lag die *in vivo* Diabetesrate bei dem Peptid mIGRP 225-233 von den als diabetogen beschriebenen Epitopen FNL 9, IGRP 241-249 und mIGRP 225-233 mit 66.7% am höchsten (verglichen zu 41.7% bei FNL 9 und 25% bei IGRP 241-249). Dies ist nicht kongruent zu den ermittelten *in vitro* Resultaten mit einer deutlich höheren Bindungsaffinität von FNL 9 verglichen mit mIGRP 225-233. Erwartet wäre eher eine höhere Bindungsaffinität des Peptids mIGRP 225-233 aufgrund dessen *in vivo* nachgewiesener größeren Diabetogenität.

IGRP 241-249

Die niedrigste Bindungsaffinität zeigte das Epitop IGRP 241-249. Hier war durchschnittlich eine Peptidkonzentration von $48\mu\text{M}$ notwendig, um eine MHC-Klasse 1 Molekül-Stabilisierung um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluoreszenz zu erreichen. In beiden Versuchsteilen waren mit $45\mu\text{M}$ (V1) und $52\mu\text{M}$ (V2) vergleichbare Peptid-

konzentrationen notwendig, um das Doppelte der gemessenen Hintergrundfluoreszenz zu erreichen. Die Bindungsaffinität der Epitope GP 276-286 und FNL 9 lag mit einer benötigten Peptidkonzentration von $14.5\mu\text{M}$ deutlich höher und das Peptid mIGRP 225-233 zeigte eine ähnliche Affinität (Peptidkonzentration mIGRP 225-233: $44\mu\text{M}$). Werden die *in vitro* Resultate mit denen der *in vivo* Versuche verglichen, zeigt sich im *in vitro* Teil die geringste Bindungsaffinität, passend zu der *in vivo* niedrigsten Diabetesrate (25%) für IGRP 241-249 unter den untersuchten, in der Literatur als diabetogen beschriebenen Epitopen FNL 9, mIGRP 225-233 und IGRP 241-249.

Zusammenfassung der Ergebnisse der FACS-Analyse

Zusammenfassend zeigte sich keine eindeutig kongruente Korrelation der Bindungsaffinität der Peptide zu den entsprechenden Diabetesraten. Zwar konnte eine starke Korrelation der Bindungsaffinität der Peptide GP 276-286 und IGRP 241-249 mit der *in vivo* gemessenen Diabetesrelevanz aufgezeigt werden (s. Kap. 3.1.6 und Kap. 3.1.12). Bei FNL 9 war die Bindungsaffinität jedoch deutlich höher im Vergleich zu der *in vivo* Diabetesrate (s. Kap. 3.1.10). Unter Verwendung von mIGRP 225-233 waren ebenfalls inkongruente Ergebnisse auffällig: in der *in vivo* Verwendung (s. Kap. 3.1.14) zeigte das Peptid die höchsten Diabetesraten (unter den als diabetogen beschriebenen Epitopen FNL 9, IGRP 241-249 und mIGRP 225-233), wo hingegen die Bindungsaffinität des Peptids bei den *in vitro* Versuchen am zweitniedrigsten lag (s. Tab. 3.11). Es wären weitere, über diese Arbeit hinausführende Experimente notwendig, um zu prüfen, ob die Diabetogenität von speziellen Peptiden tatsächlich von deren Bindungsaffinität an MHC-Klasse 1 Moleküle abhängig ist.

Tabelle 3.11: Ergebnisse der FACS-Analyse

Peptid	Versuch	Konzentration Peptid
GP 276-286	V1 (08/2009)	19 μ M
	V2 (02/2010)	10 μ M
	V1+V2 (gesamt)	14.5μM
FNL 9	V1 (08/2009)	20 μ M
	V2 (02/2010)	9 μ M
	V1+V2 (gesamt)	14.5μM
mIGRP 225-233	V1 (08/2009)	36 μ M
	V2 (02/2010)	52 μ M
	V1+V2 (gesamt)	44μM
IGRP 241-249	V1 (08/2009)	45 μ M
	V2 (02/2010)	52 μ M
	V1+V2 (gesamt)	48μM

4

Diskussion

4.1 Zellimmunisierungen im RIP-CD80+GP+ Mausmodell

Harlan konnte 1994 zeigen, dass es im transgenen RIP-CD80+ Mausmodell möglich ist Autoimmundiabetes antigenspezifisch zu induzieren (Harlan 1994). RIP-CD80+ Mäuse exprimieren das kostimulatorische CD80(=B7-1)-Molekül auf den pankreatischen β -Zellen. Dadurch sind sie empfänglich für den Angriff von Immunzellen. Verschiedenste Immunisierungsarten mit Agenzien, die eine Immunreaktion gegen in den β -Zellen exprimierte Proteine auslösen, können zur β -Zellzerstörung und Diabetesentwicklung in RIP-CD80+ Mäusen führen (Harlan 1995; v. Herrath 1995; Karges 2002; Rajasalu 2004). Ohashi etablierte ein Mausmodell, in dem das Glykoprotein aus dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV-GP) als experimentelles β -Zellautoantigen (Modellantigen/Positivkontrolle) dient, wenn es ebenfalls transgen unter dem Ratteninsulinpromoter in den pankreatischen β -Zellen exprimiert wird (Ohashi 1991). Immunisierungen mit LCMV-GP führen über eine β -Zellzerstörung folglich zur Diabetesinduktion. Das bitransgene Mausmodell RIP-CD80+ x RIP-GP+ für induzierbaren Autoimmundiabetes wurde in Folge genutzt, um die Grundlagen des Autoimmundiabetes und der auftretenden autoimmunen T-Zellreaktion zu analysieren (Pechhold 2001; Pechhold 2003; Pechhold 2007).

Reife dendritische Zellen fungieren als professionelle, Antigen-präsentierende Zellen

im Immunsystem. Eine potente Immunisierungsmethode ist die intraperitoneal Injektion von aus dem Knochenmark von Spendermäusen isolierten und in der Zellkultur ausgereiften dendritischen Zellen (BM-DC), die mit Diabetes-relevanten Peptiden beladen sind. Pechhold zeigte, dass Immunisierungen mit dem dominanten (LCMV-GP 33-41) und dem subdominanten (LCMV-GP 276-286) zytotoxischen Epitop, die im LCMV-GP Modellantigen translatiert werden, zur zuverlässigen β -Zellzerstörung und Diabetesmanifestation in RIP-CD80+GP+ Mäusen führen (Pechhold 2007). Des Weiteren wies er nach, dass es unter Verwendung des irrelevanten Epitops LCMV-NP 396-404 zu keiner Diabetesinduktion kommt. Die Korrelation zwischen Peptidaffinität und -konzentration, die für die Beladung der BM-DC benutzt wurde, und dem Zeitraum bis zur Diabetesmanifestation zeigte eine prädiktive Aussagekraft über die Diabetesrelevanz der verwendeten Epitope. Damit ist diese Methode im RIP-CD80+GP+ Mausmodell anwendbar, um *in vivo* die Diabetesrelevanz von T-Zellepitopen (= Peptide aus 8 bis 10 Aminosäuren) zu überprüfen (Pechhold 2007).

In der Literatur werden CD8+ T-Zellepitope beschrieben, denen aufgrund verschiedener T-Zellcharakterisierungsmethoden eine relevante Rolle in der Diabetes-assoziierten Autoimmunität zugesprochen wird (DiLorenzo 2007). Von diesen Peptiden wurden für diese Arbeit drei ausgewählt: FNL 9, IGRP 241-249 und mIGRP 225-233. Bezüglich der tatsächlichen Diabetogenität wird FNL 9 bis dato ein Evidenzlevel A (Evidenz, dass das Epitop von einem ganzen Protein präsentiert wird und die T-Zellantwort spontan erfolgt) sowie IGRP 241-249 und mIGRP 225-233 ein Evidenzlevel B (keine Evidenz, dass das Epitop von einem ganzen Protein präsentiert wird, jedoch spontane T-Zellantwort) (DiLorenzo 2007) zugesprochen.

Im NOD-Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Peptide aus dem der katalytischen Untereinheit der Insel-spezifischen Glukose-6-Phosphatase verwandten Protein eine Rolle in der Diabetesentwicklung spielen (Krishnamurthy 2006; Nakayama 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte dies für die Epitope IGRP 241-249 und mIGRP 225-233 (Takaki 2006; Ouyang 2006; Han 2005b) unter Verwendung des RIP-CD80+GP+ Mausmodell bestätigt werden.

Lieberman identifizierte im NOD-Mausmodell u.a. das Peptid FNL 9 aus der DMK = Dystrophia-Myotonica-Kinase als möglichen Auslöser einer T-Zellvermittelte Autoimmunreaktion gegen die β -Zellen des Pankreas (Lieberman 2004). In dieser Arbeit sollte

die Diabetogenität von FNL 9 unter Verwendung des RIP-CD80+GP+ Mausmodell verifiziert werden.

Um die Anwendbarkeit des Mausmodells in unserem Versuchssetting zu verifizieren, wurden die bereits von Pechhold bestätigten Positiv- und Negativkontrollen für die Immunisierungen mit den Peptid-beladenen reifen dendritischen Zellen benutzt. Für das dominante (LCMV-GP 33-41) bzw. subdominante (LCMV-GP 276-286) zytotoxische Epitop aus dem Positivautoantigen konnten mit Pechhold vergleichbare Versuchsergebnisse erzielt werden (s. Kap. 3.1.3, Kap. 3.1.4 und Kap. 3.1.5, Kap. 3.1.6). Interessanter Weise lieferte die Negativkontrolle (LCMV-NP 396-404, Peptid aus dem LCMV-Nukleoprotein, welches im verwendeten Mausmodell nicht präsent ist) in unserer Versuchsreihe abweichende Ergebnisse: Aus ungeklärten Gründen entwickelten 3 der mit LCMV-NP 396-404 immunisierten Mäuse eine diabetische Stoffwechsellage. Damit lag die Diabetesrate hier bei 25% (s. Kap. 3.1.7, Kap. 3.1.8). Pechhold hingegen vermerkte keine diabetischen Tiere unter Verwendung des LCMV-NP 396-404 (Pechhold 2007). Unsere Ergebnisse sind durchaus kritisch zu werten, denn in einem Mausmodell für induzierbaren Autoimmundiabetes sollte nach Immunisierung mit einem irrelevanten Peptids kein Diabetes auftreten. Jedoch hat das RIP-CD80+GP+ Mausmodell gewisse Limitationen: Aufgrund der transgenen Expression des kostimulatorischen CD80-Moleküls auf den β -Zellen des Pankreas wird die Diabetesinduktion (Pechhold 2003) und damit vermutlich auch die spontane Diabetesentwicklung erleichtert. Es ist daher diskutabel, ob es sich in unserem Versuch um spontan diabetische Tiere handelte. Oder es wurde durch Verwendung des Peptids aus dem LCMV-Nukleoprotein, welches im RIP-CD80+GP+ Mausmodell nicht präsent ist, eine bis dato nicht bekannte Autoimmunreaktion angestoßen, die zu einer Destruktion der β -Zellen führte. Bei den Zellimmunisierungen mit LCMV-NP 396-404 wurden Versuchstiere im Alter von 8-15 Wochen für die Peptidinjektion gewählt. Lediglich die Tiere in der Gruppe der 10-13 Wochen alten Tiere bei Immunisierung zeigten das Ergebnis einer fehlenden Diabetesinduktion bei Applikation der Negativkontrolle. In der Gruppe der 8-9 Wochen alten Tiere wurden 50% nach 125 Tagen und in der Gruppe der 14-15 Wochen alten Mäuse 33% nach 99 Tagen diabetisch (s. Kap. 3.1.7, Kap. 3.1.8). Spekuliert werden kann anhand der hier vorliegenden Ergebnisse, ob bei Verwendung von verhältnismäßig jungen bzw. alten Versuchstieren eine instabilere Disposition bzgl. der Diabetessuszepti-

bilität bzw. allgemein des Immunverhaltens vorliegt. Somit könnte das Einschließen von Tieren in mittlerem Alter zwischen 10-12 Wochen bei Immunisierung zu stabileren und damit valideren Versuchsergebnissen führen. In der genannten Studie von Pechhold (Pechhold 2007) wurden keine Angaben zum Alter der Versuchstiere gemacht, sodass hier kein Vergleich gezogen werden kann.

Im Weiteren wurde die Diabetesrelevanz von den ausgewählten (s.o.) Epitopen untersucht. In unserer Versuchsreihe der Immunisierungen mit den Peptid-beladenen reifen dendritischen Zellen war das Peptid mIGRP 225-233 mit einer Diabetesrate von 66.7% das potenteste der ausgewählten, potentiell diabetogenen Epitope (s.o.). Es konnte im Vergleich mit der Negativkontrolle signifikant ($p < 0.05$) häufiger Diabetes auslösen (s. Kap. 3.1.13, Kap. 3.1.14). Mit einer Diabetesrate von 41.7% war FNL 9 das zweitpotenteste der als Diabetes-induzierend beschriebenen Peptide (s. Kap. 3.1.9, Kap. 3.1.10). Das Peptid IGRP 241-249 zeigte eine Diabetesrate von 25%. Damit hatte es unter den als diabetogen beschriebenen Peptiden die geringste Diabetogenität (s. Kap. 3.1.11, Kap. 3.1.12). Insgesamt konnte in dieser Arbeit die Diabetesrelevanz der o.g. ausgewählten Epitope *in vivo* nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Diabetogenität der Epitope und Alter bei Immunisierung bzw. Geschlecht der Versuchstiere gab. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Alter oder Geschlecht und dem Auftreten von Diabetes nachgewiesen werden. Die z.T. leicht unterschiedlichen Diabetesraten wurden im Rahmen der statistischen Varianz gewertet.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse der HMGU-Experimente mit Resultaten aus Vorversuchen an den National Institutes of Health (NIH) verglichen, um zu bestätigen, dass auch in verschiedenen Räumlichkeiten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Reproduzierbarkeit der Versuchsreihe gegeben war. Lediglich bei den Immunisierungen mit FNL 9 fiel auf, dass die Versuchstiere am NIH früher diabetisch wurden im Vergleich zum HMGU. Diabetes manifestierte sich am NIH im Mittel innerhalb von 58 Tagen. Am HMGU erkrankten die Tiere durchschnittlich nach 82 Tagen. Mit einer Rate von 46.2% Diabeteserkrankungen am NIH verglichen mit 41.7% erkrankten Mäusen am HMGU zeigten sich jedoch insgesamt statistisch vergleichbare Ergebnisse ($p = 0.439$). Nach Applikation von IGRP 241-249 entwickelten die Mäuse am HMGU mit durchschnittlich 81 Tagen im Vergleich schneller eine diabetische Stoffwechsellage als das Versuchstier

am NIH mit 158 Tagen. In diesem Versuchssetting mit Versuchsende bei Erreichen von 20 Lebenswochen wäre die diabetische Maus des NIH mit Diabetesbeginn nach erst 158 Tagen bereits zuvor aus dem Versuch ausgeschieden und wäre dementsprechend nicht in die Liste der Diabetes-positiven Tiere aufgenommen worden. Entsprechend der in dieser Arbeit verwendeten Kriterien läge demnach die Diabetesrate am NIH bei 0%. Jedoch waren auch hier die Diabetesraten insgesamt nicht signifikant unterschiedlich. Es ist möglich, dass es durch Unterschiede in der Qualität der verwendeten BM-DC zu den unterschiedlichen Zeiträumen bis zum Auftreten von Diabetes gekommen ist. Vielleicht gab es auch Abweichungen in der Technik der Applikation der Immunisierungslösungen oder die Diabetesinduktion wurde durch zusätzliche externe Triggerfaktoren/Umweltfaktoren beschleunigt bzw. durch andere Faktoren gehemmt.

4.2 Alternative Peptidapplikationsmethoden im RIP-CD80+GP+ Mausmodell

Obwohl die Diabetesinduktion mittels Peptid/BM-DC-Transfer zuverlässig funktionierte, waren die Gewinnung der BM-DC und die Nachverfolgung der Mäuse bis zur Diabetesentstehung sehr zeitaufwändig. Daher wurde untersucht, ob andere Peptidapplikationsmethoden ebenfalls Diabetes in RIP-CD80+GP+ Mäusen auslösen können und weniger zeitaufwändig sind. Eine direkte Applikation der Peptide in PBS bzw. in Kombination mit einem Adjuvans (Imject Alum, Pierce) sollte dabei die Zeit für die BM-DC Kultivierung einsparen und eine entsprechend hohe Konzentration an verabreichtem Peptid die Beobachtungszeit bis zur Diabetesmanifestation verkürzen. Es wurde geprüft, ob ohne die sehr sensitive Methode der spezifischen Zellimmunisationen mit BM-DC in den nun durchgeführten Versuchen mit Adressierung aller Immunzellen durch reine Peptidinjektionen ebenfalls effektiv Diabetes induziert werden konnte. Für die Versuche wurde ausschließlich das dominante Epitop LCMV-GP 33-41 des Positiv-Kontrollantigens LCMV-GP verwendet, welches bereits in geringer Konzentration auf BM-DC geladen sehr effizient und zeitnah Diabetes in RIP-CD80+GP+ Mäusen auslöste (s. Kap. 3.1.3, Kap. 3.1.4). Insgesamt wurden drei Teilerperimente durchgeführt unter Verwendung des LCMV-GP 33-41 in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (50, 100 und 150µg). Im ersten Experiment wurde das Peptid subkutan in Kombination

mit PBS appliziert. Im zweiten Teilabschnitt der Experimente erfolgte die subkutane Immunisierung in Kombination mit dem Adjuvans Imject Alum (Pierce). Im dritten Versuchsteil wurde geprüft, ob mittels intraperitonealer Applikation der LCMV-GP 33-41/Adjuvans-Lösung bessere Ergebnisse in der Diabetesinduktion erzielt werden konnten, da möglicherweise mehr Immunzellen durch intraperitoneale Immunisierung adressiert wurden. In allen Versuchsteilen zeigten sich nur geringe Diabetesraten mit einer langen Dauer bis zum Auftreten von Diabetes (s. Kap. 3.2). Folglich ging die mit der geringsten Vorbereitungszeit verbundene Applikationsmethode der Peptide mit einer nicht ausreichend validen Diabetesinduktion und einer fehlenden Zeitoptimierung im Vergleich zur BM-DC Methode einher und stellt daher keine Alternative zu den Zellimmunisierungen dar.

Erwähnenswert ist, dass bei Menschen klinische Studien durchgeführt werden, die das Diabetes-assoziierte Protein GAD65 in Kombination mit einem für die Verwendung am Menschen zugelassenen Alum-Adjuvans therapeutisch s.c. einsetzen (Ludvigsson 2008a; Ludvigsson 2008b; Ludvigsson 2009). Ziel dieser Studien ist es, die Diabetes-assoziierten Immunreaktionen abzuschwächen bzw. zu stoppen. In diesem Zusammenhang haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine hohe klinische Relevanz, da sich im RIP-CD80+GP+ Mausmodell bestätigte, dass die Applikation von Diabetes-assoziierten Peptiden in Imject Alum gegensätzliche, Diabetes-fördernde Effekte auslöst. Weiterführende Studien wären hier sehr naheliegend und vielversprechend.

4.3 Charakterisierung des Peptidbindungsverhaltens

Die Diabetogenität von spezifischen Peptiden hängt unter anderem von deren Bindungsaffinität an MHC-Klasse 1 Moleküle ab (Pechhold 2007). Um dies für die verwendeten o. g. Peptide zu untersuchen, sollte mithilfe der humane Lymphoblasten-Zelllinie "T2", die transgen murine MHC-Klasse 1 H-2Db Moleküle synthetisiert, das Bindungsverhalten der jeweils verwendeten Peptide untersucht werden. Dazu wurden die Peptide in verschiedenen Konzentrationen mit den Zelllinien inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (s. Kap.2.4).

Es wurden die Bindungscharakteristika der einzelnen Peptide untersucht und verglichen, ob die jeweilige Bindungsaffinität mit der *in vivo* gemessenen Diabetesrelevanz

korrelierte. Darüber hinaus erfolgte ein Vergleich der Bindungseigenschaften der individuellen Peptide in Relation zueinander. Aufgrund von zwei gleichartig durchgeführten Messungen am HMGU München zu zwei verschiedenen Zeitpunkten konnten auch hier die Ergebnisse auf ihre Wiederholbarkeit untersucht werden. Die Peptide LCMV-GP 276-286, mIGRP 225-233, IGRP 241-249 und FNL 9 wurden analysiert. Zusammenfassend zeigte sich zwar eine starke Korrelation der *in vitro* Bindungsaffinität der Peptide LCMV-GP 276-286 und IGRP 241-249 mit der *in vivo* gemessenen Diabetesrelevanz (s. Kap. 3.1.5, Kap. 3.1.6, Kap. 3.1.11, Kap. 3.1.12). Das spricht für eine prädiktive Aussagekraft der MHC-Peptid-Bindungsaffinität für die Diabetesrelevanz dieser Peptide und korreliert mit den Ergebnissen von Pechhold (Pechhold 2007). Bei FNL 9 war die Bindungsaffinität deutlich höher im Vergleich zu der *in vivo* Diabetesrate (s. Kap. 3.1.9, Kap. 3.1.10). Jedoch waren unter Verwendung von mIGRP 225-233 paradoxe Ergebnisse auffällig: in der *in vivo* Verwendung zeigte das Peptid die höchsten Diabetesraten (s. Kap. 3.1.13, Kap. 3.1.14) unter den als diabetogen beschriebenen Epitopen, wo hingegen die Bindungsaffinität des Peptids bei den *in vitro* Versuchen am zweitniedrigsten lag. Um diese Beobachtungen genauer spezifizieren zu können, wären größer ausgelegte Folgeanalysen sinnvoll.

4.4 Ausblick

Primäre Interventionstherapien sind denkbar für die prädiabetische Phase, da die β -Zellzerstörung über mehrere Jahre stattfinden kann. Jedoch gibt es bis dato keine direkten Messverfahren, um die T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion zu analysieren (Martinuzzi 2008). Es wird stetig an neuen Messverfahren gearbeitet, um die Diabetes-assoziierte T-Zellreaktivitäten im peripheren Blut detektieren zu können (Monti 2007; Brooks-Worrell 2009; Herold 2009), bis dato leider aber ohne durchgreifenden Erfolg (Seyfert-Margolis 2006; Herold 2009). Vor allem aber fehlt der endgültige Nachweis tatsächlich relevanter Zielantigene der autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen. Hierzu wurden vielversprechende Ansätze im Tier- und insbesondere Mausmodell entwickelt, um β -Zellautoantigene auf der T-Zellebene zu identifizieren (DiLorenzo 2007). Allerdings fehlt bis heute ein zuverlässiges Modell, um die Diabetesrelevanz von murinen und humanen T-Zellepitopen *in vivo* zu überprüfen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass intraperitoneale Injektionen mit aus Knochenmark isolierten und in der Zellkultur ausgereiften dendritischen Zellen (BM-DC), die mit Diabetes-relevanten Epitopen beladen sind, zur effizienten β -Zellzerstörung und zur Diabetesmanifestation im RIP-CD80+GP+ Mausmodell führen. Es konnte bewiesen werden, dass diese Methode im RIP-CD80+GP+ Mausmodell anwendbar ist, um *in vivo* die Diabetesrelevanz von in der Literatur als diabetogen beschriebenen CD8+ T-Zellepitopen (= Peptide aus 8 bis 10 Aminosäuren) zu prüfen.

In weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe ist geplant, durch Immunisierungen mit retroviral transduzierten dendritischen Zellen neue, Diabetes-relevante CD8+ T-Zellepitope zu identifizieren und im Folgenden auch die reaktiven T-Zellen zu phänotypisieren. Um ferner auch für Menschen relevante T-Zellepitope verifizieren zu können, sind Folgeversuche geplant, bei denen die RIP-CD80+GP+ Mäuse mit Mäusen gekreuzt werden, die chimäre HLA-A2.1/Kb-MHC Klasse 1 Moleküle exprimieren (C57BL/6J-Tg(HLA-A/H2-K)1Scr/Mmnc) (Vitiello 1991; Botten 2007).

Nach erfolgreicher Identifikation und Charakterisierung von CD8+ T-Zellepitopen im humanisierten Mausmodell ist weiterhin die Etablierung der Messverfahren an menschlichen Proben geplant. Das Institut für Diabetesforschung in München verfügt über eine Biobank mit Lymphozytenproben und betreut prospektiv große Studienkohorten. Damit wäre der Zugriff auf relevantes menschliches Material gewährleistet.

5

Zusammenfassung

Typ 1 Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, bei der es zu einer Zerstörung der Insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas durch das körpereigene Immunsystem kommt. Es handelt sich um eine T-Zell-vermittelte β -Zell-Destruktion, die im Verlauf zu einem absoluten Insulinmangel und damit zur klinischen Manifestation des T1D führt. Schon lange bevor Diabetes diagnostiziert wird, können sowohl im Menschen als auch in Tiermodellen Autoantikörper detektiert werden, die gegen Inselautoantigene gerichtet sind. Durch Messung dieser Autoantikörper können individuelle Risikoprognosen erstellt werden. Die Verfolgung der Krankheitsentwicklung oder -modulation durch direkte Messung der autoreaktiven T-Zellen ist bis heute jedoch nicht möglich. Das liegt unter anderem daran, dass es noch nicht gelungen ist, tatsächlich Diabetes-relevante Inselautoantigene bzw. deren Epitope *in vivo* nachzuweisen.

Das bitransgene RIP-CD80+GP+ Mausmodell wurde seit mehr als zehn Jahren sehr detailliert studiert, um die Grundlagen des Autoimmundiabetes und der auftretenden autoimmunen T-Zellreaktion zu analysieren. RIP-CD80+GP+ Mäuse exprimieren das kostimulatorische CD80- (=B7-1) Molekül auf den pankreatischen β -Zellen, was sie speziell empfänglich für einen Angriff von Immunzellen macht. In der Literatur wurden verschiedenste Peptide beschrieben, denen eine relevante Rolle als T-Zellepitope in der Diabetes-assoziierten Autoimmunität zugesprochen wird. Allerdings wurde bis heute noch kein zuverlässiges Modell entwickelt, um dies *in vivo* zu überprüfen und zu verifizieren.

Mithilfe des bitransgenen RIP-CD80+GP+ Mausmodells für induzierbaren Autoimmundiabetes wurde im Rahmen dieser Arbeit die Diabetesrelevanz von drei ausgewählten Autoantigen-Epitopen *in vivo* analysiert. Ihnen wird in der Literatur eine CD8+ T-Zellvermittelte Autoimmundiabetesrelevanz *in vitro* zugesprochen: FNL9 aus dem Protein DMK = Dystrophia-Myotonica-Kinase und Epitope aus dem der katalytischen Untereinheit der Insel-spezifischen Glukose-6-Phosphatase verwandten Protein (hier verwendet IGRP 241-49 und mausspezifisches mIGRP 225-233).

Folgende Ergebnisse wurden erlangt:

1. Mittels intraperitonealer Injektion von peptidbeladenen dendritischen Zellen konnte unter Verwendung des RIP-CD80+GP+ Mausmodells im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Diabetogenität der in der Literatur beschriebenen, CD8+ T-Zellepitope mIGRP 225-233, IGRP 241-249 und FNL9 *in vivo* verifiziert werden.

Die höchste Diabetesrate von den *in vitro* als diabetogen beschriebenen Peptiden zeigte mit insgesamt 66.7% mIGRP 225-233 und war damit das potenteste der zu untersuchenden Peptide. Mit 41.7% war FNL 9 das zweitpotenteste der als Diabetes-induzierend beschriebenen Peptide. Nach Applikation von IGRP 241-249 entwickelten 25% der RIP-CD80+GP+ Mäuse Diabetes.

2. Die Diabetesinduktion war unabhängig von Ort und Zeit reproduzierbar (zwei gleichzeitig aufgebaute Versuchsteile am HMGU, zusätzlich Vergleich der Versuche am HMGU mit analogen Versuchen am NIH). Auch Alter und Geschlecht der Versuchstiere hatten keinen relevanten Einfluss auf die Diabetesentwicklung.

3. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse des Peptidbindungsverhaltens an murine MHC-Klasse 1 H-2Db Moleküle. Hier zeigte sich keine eindeutige Korrelation der Bindungsaffinität der Epitope zu den entsprechenden *in vivo* Diabetesraten. Es wären weitere, über diese Arbeit hinausführende Experimente notwendig, um zu prüfen, ob die Diabetogenität von den speziellen Peptiden tatsächlich von deren Bindungsaffinität an MHC-Klasse 1 Moleküle abhängig ist.

4. Aufgrund der arbeits- und zeitaufwändigen Diabetesinduktion mittels Peptid/BM-DC-Transfer wurde in Pilotstudien geprüft, ob andere Peptidapplikationsmethoden ebenfalls Diabetes in RIP-CD80+GP+ Mäusen auslösen können und weniger zeitaufwändig sind. Hierzu erfolgte eine direkte Applikation (s.c. oder i.p.) des dominanten Epitops LCMV-GP 33-41 mit und ohne Adjuvans (Imject Alum, Pierce). Keine der Applikatio-

nen führte zu einer zuverlässigen Diabetesinduktion, entsprechend konnte die Applikationsmethode des Peptid/BM-DC-Transfer nicht simplifiziert werden.

Erstmalig konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die *in vivo* Diabetesrelevanz der CD8+ T-Zellepitope mIGRP 225-233, IGRP 241-249 und FNL9 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten eine wichtige Rolle bei der Beobachtung der Krankheitsentstehung bei Kindern mit hohem Diabetesrisiko spielen und so die Grundlage zur Entwicklung präziser Methoden für die Nachverfolgung von immunmodulatorischen Therapien bilden. Denn die *in vivo* Verifikation von CD8+ T-Zellepitopen stellt die Grundlage für die Entwicklung spezifischer T-Zellmessverfahren dar. Darüber hinaus könnten die identifizierten Epitope möglicherweise als Antigen-spezifische Ziele für Immuntherapien benutzt werden, um die Diabetesentstehung zu verhindern.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Pipettierschema: Antikörperstaining Lymphoblasten-Zelllinie "T2" . . .	41
3.1	Zellimmunisierungen HMGU: V1+V2	60
3.2	Zellimmunisierungen HMGU: V1+V2 vs. V1 vs. V2	60
3.3	Zellimmunisierungen LCMV-GP 33-41	62
3.4	Zellimmunisierungen LCMV-GP 276-286	67
3.5	Zellimmunisierungen FNL 9	72
3.6	Zellimmunisierungen IGRP 241-249	74
3.7	Zellimmunisierungen mIGRP 225-233	77
3.8	Zellimmunisierungen HMGU Versuch 1+2 gesamt vs. NIH	79
3.9	Geschlechtsbezogen: LCMV-GP 33-41 HMGU vs. NIH	81
3.10	Geschlechtsbezogen: LCMV-GP 276-286 HMGU	81
3.11	Geschlechtsbezogen: LCMV-NP 396-404 HMGU	82
3.12	Geschlechtsbezogen: FNL 9 HMGU vs. NIH	82
3.13	Geschlechtsbezogen: IGRP 241-249 HMGU VS. NIH	83
3.14	Geschlechtsbezogen: mIGRP 225-233 HMGU vs. NIH	83
3.15	Peptidimmunisierungen mit LCMV-GP 33-41 (HMGU)	88

Literaturverzeichnis

- [Achenbach 2004a] Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E:
Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes,
J. Clin. Invest. **114** 4, 589-97 (2004).
- [Achenbach 2004b] Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG:
Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics,
Diabetes **53** 2, 384-92 (2004).
- [Achenbach 2005] Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG:
Natural history of type 1 diabetes,
Diabetes **54** Suppl. 2, 25-31 (2005).
- [Achenbach 2007] Achenbach P, Schlosser M, Williams AJ, Yu L, Mueller PW, Bingley PJ, Bonifacio E:
Combined testing of antibody titer and affinity improves insulin autoantibody measurement: Diabetes Antibody Standardization Program,
Clin. Immunol. **122**, 85-90 (2007).
- [Achenbach 2008a] Achenbach P, Lampasona V, Landherr U, Koczwara K, Krause S, Grallert H, Winkler C, Pflüger M, Illig T, Bonifacio E, Ziegler AG:
Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk,
Diabetologia **52**, 1881-1888 (2009).
- [Achenbach 2008b] Achenbach P, Pan L, Ziegler AG:
Frühdiagnostik bei Typ-1-Diabetes,
Der Diabetologe **4** 1, 47-58 (2008).
- [ADA 2014] American Diabetes Association:
Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,
Diabetes Care **37** 1 (2014).

- [Asano 1996] Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S:
Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation,
J. Exp. Med. **184** 2, 387-396 (1996).
- [Atkinson 2001] Atkinson MA, Eisenbarth GS:
Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment,
Lancet **358** 9277, 221-229 (2001).
- [Bächle 2012] Bächle CC, Holl RW, Straßburger K, Molz E, Chernyak N, Beyer P, Schimmel U, Rüttschle H, Seidel J, Lepler R, Holder M, Rosenbauer J, Icks A; DPV Initiative; German BMBF Competence Network Diabetes Mellitus:
Costs of paediatric diabetes care in Germany: current situation and comparison with the year 2000,
Diabet. Med. **29** 10, 1327-1334 (2012).
- [Barnett 1981] Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA:
Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs,
Diabetologia **20**, 404-409 (1981).
- [Barrett 2009] Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Mohrhan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS; Type 1 Diabetes Genetics Consortium:
Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes,
Nature Genetics **41** 6, 703–707 (2009).
- [Berner 2004] Berner R, Bialek R, Forster J, Giani G, Hahn A, Handwerker G, von Kries R, Nowak-Göttl U, Reinalter St, Schmitt HJ, Thyen U, Vester U:
Erhebungsenheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland – Jahresbericht 2002,
Monatsschr. Kinderheilknd. **152** 1, 77-79 (2004).
- [Bingley 1997] Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA:
Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers,
Diabetes **46** 11, 1701-1710 (1997).
- [Botten 2007] Botten J, Whitton JL, Barrowman P, Sidney J, Whitmire JK, Alexander J, Ting JP, Bui HH, Sette A, Buchmeier MJ:
HLA-A2-restricted protection against lethal lymphocytic choriomeningitis,
J. Virol. **81** 5, 2307-2317 (2007).

- [Brooks-Worrell 2009] Brooks-Worrell B, Warsen A, Palmer JP:
Improved T cell assay for identification of type 1 diabetes patients,
J. Immunol. Methods **344** 1, 79-83 (2009).
- [Buschard 1983] Buschard K, Hastrup N, Rygaard J:
Virus-induced diabetes mellitus in mice and the thymus-dependent immune system,
Diabetologia **24** 1, 42-46 (1983).
- [Crissman 1975] Crissman HA, Mullaney, PF, Steinkamp JA.:
Methods and applications of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells,
Prescott. D. M., Academic Press New York, Methods in cell biology (1975).
- [DiLorenzo 2005] DiLorenzo TP, Serreze DV:
The good turned ugly: immunopathogenic basis for diabetogenic CD8+ T cells in NOD mice,
Immunol. Rev. **204**, 250-263 (2005).
- [DiLorenzo 2007] DiLorenzo TP, Peakman M, Roep BO:
Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in auto-immune diabetes,
Clin. Exp. Immunol. **148** 1, 1-16 (2007).
- [Elias 1995] Elias D, Marcus H, Reshef T, Ablamunits V, Cohen IR:
Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein,
Eur. J. Immunol. **25**, 2851-2857 (1995).
- [EURODIAB 2000] EURODIAB ACE Study Group:
Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe,
Lancet. **355** 9207, 873-876 (2000).
- [Füchtenbusch 1995] Füchtenbusch M, Ziegler AG:
Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ-I-Diabetes,
Diab. Stoffw. **4**, 1-9 (1995).
- [Gepts 1981] Gepts W, Lecompte PM:
The pancreatic islets in diabetes,
Am. J. Med. **70**, 105-115 (1981).
- [Green 2001] Green A, Patterson CC:
Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998,
Diabetologia **44** Suppl. 3, B3-B8 (2001).

- [Han 2005a] Han B, Serra P, Yamanouchi J, Amrani A, Elliott JF, Dickie P, Diloranzo TP, Santamaria P:
Developmental control of CD8 T cell-avidity maturation in autoimmune diabetes,
J Clin Invest. **115** 7, 1879-1887 (2005a).
- [Han 2005b] Han B, Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Marée AF, Edelstein-Keshet L, Santamaria P:
Prevention of diabetes by manipulation of anti-IGRP autoimmunity: high efficiency of a low-affinity peptide,
Nat Med. **11** 6, 645-52 (2005b).
- [Harlan 1994] Harlan DM, Hengartner H, Huang ML, Kang YH, Abe R, Moreadith RW, Pircher H, Gray GS, Ohashi PS, Freeman GJ:
Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** 8, 3137-3141 (1994).
- [Harlan 1995] Harlan DM, Barnett MA, Abe R, Pechhold K, Patterson NB, Gray GS, June CH:
Very-low-dose streptozotocin induces diabetes in insulin promoter-mB7-1 transgenic mice,
Diabetes **44** 7, 816-823 (1995).
- [Hauben 2001] Hauben E, Roncarolo MG, Nevo U, Schwartz M:
Beneficial autoimmunity in type 1 diabetes mellitus,
Trends in Immunology **26** 5, 248–253 (2005).
- [Herold 2009] Herold KC, Brooks-Worrell B, Palmer J, Dosch HM, Peakman M, Gottlieb P, Reijonen H, Arif S, Spain LM, Thompson C, Lachin JM:
The Type 1 Diabetes TrialNet Research Group. Validity and Reproducibility of Measurement of Islet Autoreactivity by T-cell Assays in Subjects with Early Type 1 diabetes,
Diabetes **58** 11, 2588-2595 (2009).
- [Howson 2009] Howson JM, Walker NM, Clayton D, Todd JA; Type 1 Diabetes Genetics Consortium:
Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A,
Diabetes, Obesity and Metabolism **11** suppl. 1, 31–45 (2009).
- [IDF 2011] International Diabetes Federation:
Diabetes Atlas,
5th ed., IDF, Brussels, (2011).
- [Iruretagoyena 2006] Iruretagoyena MI, Wiesendanger M, Kalergis AM:
The Dendritic Cell-T Cell Synapse as a Determinant of Autoimmune Pathogenesis,
Curr. Pharm. Des. **12** 2, 131-147 (2006).

- [Jarchum 2008] Jarchum I, Nichol L, Trucco M, Santamaria P, DiLorenzo TP:
Identification of novel IGRP epitopes targeted in type 1 diabetes patients,
Clin. Immunol. **127** 3, 359-365 (2008).
- [Karges 1995] Karges WJ, J. Ilonen B, Robinson H, Dosch HM:
Self and non-self antigen in diabetic autoimmunity: molecules and mechanisms,
Mol. Aspects Med. **16**, 79-213 (1995).
- [Karges 2002] Karges W, Pechhold K, Al Dahouk S, Riegger I, Rief M, Wissmann A, Schirmbeck R,
Barth C, Boehm BO:
*Induction of autoimmune diabetes through insulin (but not GAD65) DNA vaccination in nonobese
diabetic and in RIP-B7.1 mice,*
Diabetes **51** 11, 3237-3244 (2002).
- [Karges 2007] Karges W, Rajasalu T, Spyrtanis A, Wieland A, Boehm B, Schirmbeck R:
*The diabetogenic, insulin-specific CD8 T cell response primed in the experimental autoimmune
diabetes model in RIP-B7.1 mice,*
Eur. J. Immunol. **37** 8, 2097-2103 (2007).
- [Karvonen 2000] Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J:
Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group,
Diabetes Care **23** 10, 1516-1526 (2000).
- [Kaufman 1993] Kaufman DL, Clare-Salzler Tian MJ, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson
MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV:
*Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent
diabetes,*
Nature **366**, 69-72 (1993).
- [Kerner 2004] Kerner W, Brückel J, Böhm BO, Scherbaum WA, Kiess K:
*Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Definition, Klassifikation und Dia-
gnostik des Diabetes mellitus,*
Evidenzbasierte Leitlinie DDG – Aktualisierung (10/2004).
- [Koczwara 2003] Koczwara K, Schenker M, Schmid S, Kredel K, Ziegler AG, Bonifacio E:
*Characterization of antibody responses to endogenous and exogenous antigen in the nonobese
diabetic mouse,*
Clin. Immunol. **106** 2, 155-162 (2003).
- [Koczwara 2007a] Koczwara K, Franks AK, Harlan DM, Pechhold P:
In vivo assay for candidate cytotoxic T cell epitopes associated with autoimmune diabetes,
Acta Diabetologia **44** suppl. 1, 28 (2007).

- [Koczwara 2007b] Koczwara K, Franks AK, Zhu X, Harlan DM, Pechhold P:
Detection of diabetes-associated cytotoxic T cell epitopes using the RIP-CD80 transgenic mouse-based inducible autoimmune diabetes model,
Pre-Point Symposium, Diabetes Research Institute, Munich (2007).
- [Koczwara 2007c] Koczwara K, Muller D, Achenbach P, Ziegler AG, Bonifacio E:
Identification of insulin autoantibodies of IgA isotype that preferentially target non-human insulin,
Clin. Immunol. **124** 1, 77-82 (2007).
- [Krishnamurthy 2006] Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD, Purcell AW, Brooks AG, Gellert S, Colman PG, Harrison LC, Lew AM, Thomas HE, Kay TW:
Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP,
J. Clin. Invest. **116** 12, 3258-3265 (2006).
- [Kulmala 1998] Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M:
Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group,
J. Clin. Invest. **101** 2, 327-336 (1998).
- [Lieberman 2004] Lieberman SM, Takaki T, Han B, Santamaria P, Serreze DV, DiLorenzo TP:
Individual nonobese diabetic mice exhibit unique patterns of CD8+ T cell reactivity to three islet antigens, including the newly identified widely expressed dystrophin myotonia kinase,
J. Immunol. **173** 1, 6727-6734 (2004).
- [Ludvigsson 2008a] Ludvigsson J, Faresjö M, Hjorth M, Axelsson S, Chéramy M, Pihl M, Vaarala O, Forsander G, Ivarsson S, Johansson C, Lindh A, Nilsson NO, Aman J, Ortqvist E, Zerhouni P, Casas R:
GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes,
N. Engl. J. Med. **359** 18, 1909-1920 (2008).
- [Ludvigsson 2008b] Ludvigsson J:
For debate: are we ready for GAD-vaccination in the treatment and/or prevention of type 1 diabetes?,
Pediatr. Endocrinol. Rev. **5** 4, 871-872 (2008).
- [Ludvigsson 2009] Ludvigsson J:
Therapy with GAD in diabetes,
Diabetes Metab. Res. Rev. **25** 4, 307-315 (2009).
- [Maclaren 1999] Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, DeSilva M, Vander Vegt P, Notkins A, Krischer

- J:
Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives,
 J. Autoimmun **12** 4, 279-287 (1999).
- [Makino 1980] Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y:
Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice,
 Jikken Dobutsu **29**, 1-13 (1980).
- [Martinuzzi 2008] Martinuzzi E, Lemonnier FA, Boitard C, Mallone R:
Measurement of CD8 T cell responses in human type 1 diabetes,
 Ann. N. Y. Acad. Sci. **1150**, 61-67 (2008).
- [Mellanby 2009] Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J:
Role of regulatory T-cells in autoimmunity,
 Clin. Sci. (Lond). **116**, 8, 639-649 (2009).
- [Metcalf 2001] Metcalfe KA, Hitman GA, Rowe RE, Hawa M, Huang X, Stewart T, Leslie RD:
Concordance for type 1 diabetes in identical twins is affected by insulin genotype,
 Diabetes Care **24** 5, 838-842 (2001).
- [Monti 2007] Monti P, Scirpoli M, Rigamonti A, Mayr A, Jaeger A, Bonfanti R, Chiumello G, Ziegler AG, Bonifacio E:
Evidence for in vivo primed and expanded autoreactive T cells as a specific feature of patients with type 1 diabetes,
 J. Immunol. **179** 9, 5785-5792 (2007).
- [Murphy 2009] Myers MA, Laks MR, Feeney SJ, Mandel TE, Koulmanda M, Bone A, Barley J, Rowley MJ, Mackay IR:
Janeway Immunologie ,
 Spektrum Akademischer Verlag **9. Ed.** Heidelberg (2009).
- [Myers 1998] Myers MA, Laks MR, Feeney SJ, Mandel TE, Koulmanda M, Bone A, Barley J, Rowley MJ, Mackay IR:
Antibodies to ICA512/IA-2 in rodent models of IDDM,
 J. Autoimmun. **11**, 265-72 (1998).
- [Nagata 2004] Nagata M, Kotani R, Moriyama H, Yokono K, Roep BO, Peakman M:
Detection of autoreactive T cells in type 1 diabetes using coded autoantigens and an immunoglobulin-free cytokine ELISPOT assay: report from the fourth immunology of diabetes society T cell workshop,
 Ann. N. Y. Acad. Sci. **1037**, 10-15 (2004).

- [Nakayama 2005] Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS:
Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice,
Nature **435** 7039, 220-223 (2005).
- [Nakhooda 1977] Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB:
The spontaneously diabetic Wistar rat,
Diabetes **26**, 100-112 (1977).
- [Neu 2001] Neu A, Ehehalt S, Willasch A, Kehrner M, Hub R, Ranke MB:
Rising incidence of type 1 diabetes in Germany: 12-year trend analysis in children 0-14 years of age,
Diabetes Care **24** 4, 785-786 (2001).
- [Ohashi 1991] Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinker-nagel RM, Hengartner H:
Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice,
Cell **65** 2, 305-317 (1991).
- [Olmos 1988] Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD:
The significance of the concordance rate for type-1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins,
Diabetologia **31**, 747-750 (1988).
- [Onkamo 1999] Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J:
Worldwide increase in incidence of Type I diabetes - the analysis of the data on published incidence trends,
Diabetologia **42**, 1395-1403 (1999).
- [Orešič 2008] Orešič M, Simell S, Sysi-Aho M, Nääntö-Salonen K, Seppänen-Laakso T, Parikka V, Kata-jamaa M, Hekkala A, Mattila I, Keskinen P, Yetukuri L, Reinikainen A, Lähde J, Suortti T, Hakalax J, Simell T, Hyöty H, Veijola R, Ilonen J, Lahesmaa R, Knip M, Simell O:
Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes,
The Journal of Experimental Medicine **205** 13, 2975–2984 (2008).
- [Ouyang 2006] Ouyang Q, Standifer NE, Qin H, Gottlieb P, Verchere CB, Nepom GT, Tan R, Panagiotopoulos C:
Recognition of HLA class I-restricted beta-cell epitopes in type 1 diabetes,
Diabetes **55** 11, 3068-3074 (2006).

- [Panagiotopoulos 2004] Panagiotopoulos C, Trudeau JD, Tan R:
T-cell epitopes in type 1 diabetes,
Curr. Diab. Rep. **4** 2, 87-94 (2004).
- [Pechhold 2001] Pechhold K, Patterson NB, Blum C, Fleischacker CL, Boehm BO, Harlan DM:
Low dose streptozotocin-induced diabetes in rat insulin promoter-mCD80-transgenic mice is T cell autoantigen-specific and CD28 dependent,
J. Immunol. **166** 4, 2531-2539 (2001).
- [Pechhold 2003] Pechhold K, Karges W, Blum C, Boehm BO, Harlan DM:
Beta cell-specific CD80 (B7-1) expression disrupts tissue protection from autoantigen-specific CTL-mediated diabetes,
J. Autoimmun. **20** 1, 1-13 (2003).
- [Pechhold 2007] Pechhold K, Chakrabarty S, Harlan DM:
Cytotoxic T cell-mediated diabetes in RIP-CD80 transgenic mice: autoantigen peptide sensitivity and fine specificity,
Ann. N. Y. Acad. Sci. **1103**, 132-142 (2007).
- [Pechhold 2008] Pechhold K, Koczwara K:
Immunomodulation of autoimmune diabetes by dendritic cells,
Curr. Diab. Rep. **8** 2, 107-113 (2008).
- [Pennline 1994] Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M:
Recombinant human IL-10 (rHUIL-10) prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse,
Clin. Immunol. Immunopathol **71**, 169-175 (1994).
- [Pinkse 2005] Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO:
Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **102** 51, 18425-18430 (2005).
- [Rabinovitch 1994] Rabinovitch A:
Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation,
Diabetes **43**, 613-621 (1994).
- [Rajasalu 2004] Rajasalu T, Barth C, Spyralis A, Durinovic-Belló I, Uibo R, Schirmbeck R, Boehm BO, Karges W:
Experimental autoimmune diabetes: a new tool to study mechanisms and consequences of insulin-specific autoimmunity,
Ann. N. Y. Acad. Sci. **1037**, 208-215 (2004).

- [Rammensee 1999] Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S:
SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs,
Immunogenetics **50** 3-4, 213-219 (1999).
- [Rapoport 1993] Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P,
Dan- ska JS, Delovitch TL:
IL-4 reverses T cell proliferation unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in NOD mice,
J. Exp. Med. **178**, 87-99 (1993).
- [Roll 1997] Roll U, Ziegler AG:
Combined antibody screening for improved prediction of IDDM - modern strategies,
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes **105**, 1-14 (1997).
- [Rosenbauer 2002] Rosenbauer J, Icks A, Giani G:
Incidence and prevalence of childhood diabetes in Germany - model-based national estimates,
J. Pediatr. Endocrinol. Metab. **15** 9, 1497-1504 (2002).
- [Santamaria 2008] Santamaria P:
Genetic and therapeutic control of diabetogenic CD8+ T cells,
Novartis Found Symp. **292**, 130-145 / 202-203 (2008).
- [Scherbaum 2004] Scherbaum WA, Kiess W, Giani G, Janka HU, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A,
Rathmann W, Rosenbauer J:
*Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Epidemiologie und Verlauf des
Diabetes mellitus in Deutschland*,
Evidenzbasierte Leitlinie DDG – Aktualisierung 05/2004.
- [Schlosser 2005] Schlosser M, Koczwara K, Kenk H, Strebelow M, Rjasanowski I, Wassmuth R, Achen-
bach P, Ziegler AG, Bonifacio E:
*In insulin-autoantibody-positive children from the general population, antibody affinity identifies
those at high and low risk*,
Diabetologia **48** 9, 1830-1832 (2005).
- [Seyfert-Margolis 2006] Seyfert-Margolis V, Gisler TD, Asare AL, Wang RS, Dosch HM, Brooks-
Worrell B, Eisenbarth GS, Palmer JP, Greenbaum CJ, Gitelman SE, Nepom GT, Bluestone JA,
Herold KC:
*Analysis of T-cell assays to measure autoimmune responses in subjects with type 1 diabetes: results
of a blinded controlled study*,
Diabetes **55** 9, 2588-2294 (2006).
- [Shapiro2003] Shapiro HM.:
Practical Flow Cytometry,
Wiley-Liss, New York (2003).

- [Shoda 2005] Shoda LK, Young DL, Ramanujan S, Whiting CC, Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Mathis D, Rossini AA, Campbell SE, Kahn R, Kreuwel HT:
A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation,
Immunity **23** 2, 115-126 (2005).
- [Tang2006] Tang Q, Bluestone JA:
Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity ,
Immunol. Rev. **212**, 217-237 (2006).
- [Takaki 2006] Takaki T, Marron MP, Mathews CE, Guttman ST, Bottino R, Trucco M, DiLorenzo TP, Serreze DV:
*HLA-A*0201-restricted T cells from humanized NOD mice recognize autoantigens of potential clinical relevance to type 1 diabetes,*
J. Immunol. **176** 5, 3257-3265 (2006).
- [Taneja 1999] Taneja V, David CS:
HLA class II transgenic mice as models of human diseases,
Immunol. Rev. **169**, 67-79 (1999).
- [Tian 1997] Tian J, Lehmann PV, Kaufman DL:
Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens,
J. Exp. Med. **186**, 2039-2043 (1997).
- [Todd 2007] Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG:
Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes,
Nature Genetics **39** 7, 857–864 (2007).
- [Tsai 2008] Tsai S, Shameli A, Santamaria P:
CD8+ T cells in type 1 diabetes,
Adv. Immunol. **100**, 79-124 (2008).
- [Tuomilehto 2013] Tuomilehto J:
The emerging global epidemic of type 1 diabetes,
Curr. Diab. Rep. **13**, 795-804(2013).
- [Verge 1996] Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS:

Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies,
Diabetes **45** 7, 926-933 (1996).

[Vitiello 1991] Vitiello A, Marchesini D, Furze J, Sherman LA, Chesnut RW:
Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex,
J. Exp. Med. **173** 4, 1007-1015 (1991).

[v. Herrath 1995] von Herrath MG, Guerder S, Lewicki H, Flavell RA, Oldstone MB:
Coexpression of B7-1 and viral (self) transgenes in pancreatic beta cells can break peripheral ignorance and lead to spontaneous autoimmune diabetes,
Immunity. **3** 6, 727-738 (1995).

[Walter 2003] Walter M, Albert E, Conrad M, Keller E, Hummel M, Ferber K, Barratt BJ, Todd JA, Ziegler AG, Bonifacio E:
IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity,
Diabetologia **46**, 712-720 (2003).

[Wegmann 1994] Wegmann Dale R, Norbury-Glaser M, Schloot N, Dylan D:
Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice,
J. Autoimmun. **7**, 833-843 (1994).

[Wong 1999a] Wong FS, Janeway CA Jr.:
Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models,
Curr. Opin. Immunol. **11** 6, 643-647 (1999).

[Wong 1999b] Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, Shastri N, Pamer EG, Janeway CA Jr.:
Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library,
Nat. Med. **5** 9, 1026-1031 (1999).

[Ylinen 2000] Ylinen L, Teros T, Liukas A, Arvilommi P, Sainio-Pöllänen S, Veräjänkorva E, Pöllänen P, Simell O:
The role of lipid antigen presentation, cytokine balance, and major histocompatibility complex in a novel murine model of adoptive transfer of insulinitis,
Pancreas **20** 2, 197-205 (2000).

[Ziegler 1999] Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E:
Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents

with type 1 diabetes: the 2- year analysis of the German BABYDIAB Study,
Diabetes **48** 3, 460-468 (1999).

[Ziegler 1994] Ziegler AG, Standl E:

Typ-I-Diabetes: Pathogenese einer Immunkrankheit,
Dtsch. Med. Wschr. **119**, 705-706 (1994).

Publikationsliste

Wissenschaftliche Artikel

- Pittet O, Nocito A, Balke H, Duvoisin C, Clavien PA, Demartines N, Hahnloser D:
Rectal enema is an alternative to full mechanical bowel preparation for primary rectal cancer surgery
Colorectal Dis. Ahead of print (2015).
- Osto E, Doytcheva P, Corteville C, Bueter M, Dörig C, Stivala S, Buhmann H, Colin S, Rohrer L, Hasballa R, Tailleux A, Wolfrum C, Tona F, Manz J, Vetter D, Spliethoff K, Vanhoutte PM, Landmesser U, Pattou F, Staels B, Matter CM, Lutz TA, Lüscher TF:
Rapid and Body Weight-Independent Improvement of Endothelial and HDL Function After Roux-en-Y Gastric Bypass: Role of Glucagon-Like Peptide-1 Circulation. **131**, 10, 871-881 (2015).
- Buhmann H, Nocito A:
Stuhlinkontinenz - ein Update
Praxis (Bern 1994) **103**, 22, 1313-1321 (2014).
- Buhmann H, le Roux CW, Bueter M:
The gut-brain axis in obesity
Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. **28**, 4, 559-571 (2014).
- Buhmann H, Vines L, Schiesser M:
Operative strategies for patients with failed primary bariatric procedures
Dig. Surg. **31**, 1, 60-66 (2014).

- Buhmann H, Nocito A:
Stuhlinkontinenz - Was gibt es Neues?
Hausarzt Praxis **9**, 1, (2014).
- Fuchs YF, Adler K, Lindner A, Karasinsky A, Wilhelm C, Weigelt M, Balke H, Förtsch K, Mortler-Hildebrandt LF, Harlan DM, Pechhold K, Ziegler AG, Bonifacio E:
Igrp and insulin vaccination induce CD8+ T cell mediated autoimmune diabetes in the RIP-CD80GP mouse
Clin. Exp. Immunol. **176**, 2, 199-206 (2014).
- Balke H, Nocito A:
A trip through the history of obesity
Praxis (Bern 1994) **102**, 2, 77-83 (2013).

Poster

- Balke H, Novak A, Gubler C, Guggenheim M, Clavien PA, Nocito A:
Over-the-scope clip (OTSC) Proctology for recurrent recto-neovaginal fistula in a male-to-female transsexual
Jahreskongress der Schweizerischen Gesellschaft für Chirurgie, Bern, 2013.
- Pittet O, Nocito A, Balke H, Duvoisin C, Clavien P-A, Demartines N, Hahnloser D:
Full mechanical bowel preparation is not necessary for primary rectal cancer surgery
Schweizerischer Viszeral- und Gastroenterologenkongress, Interlaken, 2012.
- Adler K, Fuchs Y, Balke H, Foertsch K, Mortler-Hildebrandt L, Spanner A, Pechhold K, Harlan D, Ziegler A, Bonifacio E:
Antigens and epitopes leading to autoimmune diabetes in RIP-CD80+GP+mice
World Immune Regulation Meeting, Davos, 2011.

Curriculum Vitae

Persönliche Information

Name: Helena Andrea Buhmann (geb. Balke)

Geburtsdatum und -ort: 19. Juli 1984 (Recklinghausen, Deutschland)

Nationalität: deutsch

Beruf

ab 01.08.2015: Assistenzärztin am Interdisziplinären Notfallzentrum, Kantonsspital Baden

15.01.2014 - 31.12.2014: Forschungsrotation am Institut für Veterinärphysiologie, Universität Zürich (Betreuer: Herr Prof. Dr. T.A. Lutz) zum Thema *“Einfluss der RYGB-Chirurgie auf den Glukose-, Fett- und Leberstoffwechsel im Tiermodell”*

01.09.2011 - 31.12.2013: Assistenzärztin an der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsspital Zürich (Klinikdirektor: Herr Prof. Dr. P.A. Clavien)

Studium

21.06.2011: Erteilung der Approbation

13.05.2011: Bestehen der Ärztlichen Prüfung

09/2004 - 05/2011: Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

03/2009-10/2009: Forschungssemester zur Anfertigung der Dissertation *“Identifikation und Verifikation von diabetogenen T-Zellepitopen unter Verwendung des induzierbaren RIP-CD80+GP+ Mausmodells für Autoimmundiabetes”* in der Forschergruppe Diabetes der Technischen Universität München und am Institut für Diabetesforschung der

Forschergruppe Diabetes e.V. am Helmholtz Zentrum München (Betreuerin: Frau Prof. Dr. A.G. Ziegler)

08.09.2006: Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Klinische Erfahrung

10/2010 - 01/2011: PJ-Tertial Chirurgie am UniversitätsSpital Zürich, Schweiz

06/2010 - 10/2010: PJ-Tertial Innere Medizin am Spital Uster, Schweiz

02/2010 - 06/2010: PJ-Wahltertial Pädiatrie am Zentrum für Kinderheilkunde des Universitätsklinikums Bonn, Deutschland

09/2009: Klinisches Wahlfach Kinderkardiologie am Zentrum für Kinderheilkunde des Universitätsklinikums Bonn, Deutschland

09/2008: Famulatur Neuropathologie an der Universitätsklinik Bonn, Deutschland

03/2008: Famulatur Pädiatrie am St. Anna Kinderspital, Wien, Österreich

09/2007: Famulatur Psychiatrie und Psychotherapie an der Dr. von Ehrenwall'schen Klinik, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland

03/2007: Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsfrauenklinik Bonn, Deutschland

Schule

15.03.2004: Abitur

1995 – 2004: Privates Gymnasium der Ursulinen Calvarienberg, Bad Neuenahr-Ahrweiler

1993 – 1995: Grundschule Ahrweiler, Aloisiuschule, Bad Neuenahr-Ahrweiler

1991 – 1993: Grundschule Kohlkamp, Recklinghausen

Danksagung

Frau Prof. Dr. Anette-G. Ziegler möchte ich herzlich danken, dass sie als meine Doktormutter die Durchführung dieser Dissertation ermöglichte und mich in der Phase der Fertigstellung mit wertvollen Hinweisen unterstützte. Insbesondere möchte ich ihr für die begeisternde Zusammenarbeit und ihren persönlichen Einsatz, der mir u.a. den Besuch von nationalen Kongressen ermöglichte, sowie die zahlreichen Anregungen, die das Voranschreiten und die Fertigstellung dieser Arbeit gefördert haben, bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Kerstin Adler für ihre intensive Betreuung und Unterstützung bei der Planung und der praktischen Durchführung meiner Projekte bedanken. Ihre Unterstützung bei der Verwirklichung der Projekte sowie die gemeinsame Diskussion der Ergebnisse waren immer sehr motivierend für mich und haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank geht an das gesamte Team der Forschergruppe Diabetes der TU München und der Forschergruppe Diabetes e.V. am Helmholtz Zentrum München. Ich wurde sehr herzlich aufgenommen und habe die nette und angenehme Arbeitsatmosphäre geschätzt. Jederzeit erhielt ich freundschaftliche Unterstützung bei meinen Projekten und konnte diese in vielen motivierenden Diskussionen vorantreiben. Ein Highlight während meiner Zeit in München war das Oktoberfestsymposium- sowohl wissenschaftlich inspirierend als auch mit dem abendlichen Besuch des Oktoberfestes eine wunderschöne, in Erinnerung bleibende Feier. Danken möchte ich Frau Franziska Meier-Stiegen für ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen sowie Annette Knopff und Ulrike Mollenhauer für ihre Tipps und Bemühungen bei den alltäglichen Laborarbeiten.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Jogi und meiner Familie, die mich von Anfang an bei diesem Vorhaben unterstützt und mir dadurch die Durchführung dieser Arbeit überhaupt ermöglicht haben.