

**Aus dem
Deutschen Diabetes-Zentrum / Deutsche Diabetes Klinik
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Die Analyse des Einflusses von IL-18 auf die Insulitis und die
Diabetesentwicklung spontan diabetischer NOD-Mäuse**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Andreas Hausmann

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: Priv.-Doz. Dr. Helga Rothe
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dieter Kröncke

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

*"...man soll sich auf die Beobachtung mehr verlassen als auf die
Vernunftgründe, auf diese überhaupt nur,
wenn sie mit den Erscheinungen in Einklang sind..."*

Aristoteles, "Über die Zeugung der Geschöpfe"
Übersetzung P. Gohlke, Schöningh, Paderborn 1959

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Der Diabetes mellitus (D. m.)

1.2 Die Pathogenese des Typ 1 D. m.

1.2.1 Genetische Prädisposition und Auslösfaktoren

1.2.2 Tiermodelle des Typ 1 D.m.

1.2.3 Die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese des Typ 1 D.m.

1.2.4 Humorale und zelluläre Immunität

1.2.5 APCs - Antigen Präsentierende Zellen

1.2.5.1 Der Einfluss der APCs auf die T-Lymphozyten

1.2.5.2 Die Rolle der APCs bei der β -Zell- Zerstörung

1.2.6 T-Lymphozyten und Zytokine

1.3 Zielsetzung der Arbeit

2. Material

2.1 Versuchstiere

2.2 Behandlungsmaterialien

2.3 Geräte für histologische Methoden

2.4 Geräte für molekularbiologische Methoden

2.5 Laborgeräte (allgemein)

2.6 Verbrauchsmaterial

2.7 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

2.7.1 Chemikalien

2.7.2 Molekularbiologische Reagenzien

2.7.2.1 Allgemeine Reagenzien

2.7.2.2 Primer

2.7.2.3 Reverse Transcription-PCR

2.7.2.4 Reagenzien zur Herstellung des radioaktiven Hybridisierungs-

Labels

2.8 Lösungen und Puffer

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Behandlung der Tiere

3.1.2 Tötung und Organentnahme

3.2 Histologische Methoden

3.2.1 Gefrierschnitttechnik

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin - (HE) -Färbung

3.2.3 Mikroskopieren und Bestimmung der Insulitisgrade

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation, Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle

3.3.2 Reverse Transkription (RT) und Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.3.3 DNA-Elektrophorese

3.3.4 Southern Blot

3.3.5 Southern Hybridisierung

3.3.5.1 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragments mit
Random Primed Labeling

3.3.5.2 Hybridisierung des radioaktiven Labels mit der
membrangebundenen DNA

3.3.5.3 Quantifizierung der Radioaktivität mittels Pospho-Imager

3.4 Statistische Methoden

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Ergebnisse

4.1.1 Vergleich der Diabetes-Inzidenz von IL-18 behandelten und unbehandelten NOD-Mäusen

4.2 Histologische Ergebnisse

4.2.1 Vergleich des Verhältnisses Peri- versus Intrainsulitis der IL-18 behandelten und unbehandelten NOD-Mäuse

4.3 mRNA Expression

4.3.1 Vergleich der Expression der mRNA von Th1- und Th2-Zytokinen in IL-18 behandelten und kontroll-behandelten NOD-Mäusen

4.3.1.1 IFN γ mRNA Expression

4.3.1.2 IL-10 mRNA Expression

4.3.1.3 IL-4 mRNA Expression

4.3.1.4 Verhältnis von Th1- und Th2 Zytokin mRNA Expression

4.3.2 Einfluss der IL-18 Behandlung auf die mRNA Expression der Th1-induzierenden Makrophagen-Zytokine

4.3.2.1 Endogene IL-18 mRNA Expression

4.3.2.2 IL-12 mRNA Expression

4.3.3 iNOS mRNA Expression

4.3.4 Korrelation von iNOS mRNA Expression mit den Verhältnissen von IFN γ /IL-10 und IFN γ /IL-4 mRNA Expression und destruktiver Insulitis

5. Diskussion

5.1 Der Einfluss von IL-18 auf den Diabetesverlauf der NOD-

Maus

5.1.1 Der Einfluss von IL-18 auf den klinischen Diabetesverlauf der NOD-Mäuse

5.1.2 Der Einfluss von IL-18 auf die entzündlichen Veränderungen in den Pankreata der NOD-Mäuse

5.1.3 Der Einfluss von IL-18 auf die mRNA Expression immunregulatorischer Zytokine

5.1.3.1 Die T-Helferzell-Zytokine IFN γ , IL-10 und IL-4

5.1.3.2 Die Zytokine des angeborenen Immunsystems IL-12 und IL-18

5.1.3.3 Die iNOS-Expression

5.2 Modulation des autoimmunen Geschehens durch IL-18

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Verwendete Abkürzungen

9. Danksagung

1. Einleitung

1.1 Der Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine erbliche chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin beruht und in deren Folge, zumeist erst nach längerer Krankheitsdauer, Schäden an Blutgefäßen und Nervensystem auftreten können (*Mehnert et al. 1984*).

Neben einigen spezifischen Typen, wie sekundäre Endokrinopathien, medikamentösem D.m., Gestationsdiabetes, genetischen Defekten der β -Zellfunktion, etc., werden nach WHO und ADA (American Diabetes Association 1997) im wesentlichen zwei Typen des Diabetes mellitus unterschieden:

Der *Typ 1 D.m.*, auch als juveniler oder insulinpflichtiger (*IDDM*) bezeichnet, der auf eine β -Zell-Destruktion mit nachfolgendem absoluten Insulinmangel zurückgeht.

Der *Typ 2 D.m.*, der sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstreckt.

Die Prävalenz manifester Diabetiker in Europa und den USA beträgt ca. 7.5% mit höheren Zahlen im Alter. 1/10 der Fälle entfällt auf den Typ1, 9/10 entsprechend auf den Typ2, dessen Auftreten mit dem Ausmaß der Überernährung in einer Population zusammenhängt (*Kolb H. 1990*). Die Prävalenz des Typ 1 liegt somit etwa bei 0.5-0.75% mit etwa einer halben Millionen Erkrankten in Deutschland. Für beide Diabetes Typen besteht eine genetische Prädisposition (s.a. 1.3). Eine polygene multifaktorielle Vererbung mit unterschiedlicher Penetranz der Merkmale wird postuliert. Beim Typ 1 D.m. beträgt das Erkrankungsrisiko für Kinder eines erkrankten Vaters 5%, einer erkrankten Mutter 2.5%. Sind beide Elternteile erkrankt, liegt das Risiko bei 20%; bei eineiigen Zwillingen zwischen 30 und 60% (*Rossini et al. 1985*). Die Erblichkeit beim Typ 2 D.m. ist ausgeprägter. Kinder eines diabetischen Elternteils erkranken in bis zu 50% der Fälle. Das Risiko bei eineiigen Zwillingen liegt bei nahezu 100%.

Der Typ 2 D.m. entwickelt sich bevorzugt im Rahmen des metabolischen Syndroms, auch als "Wohlstandssyndrom" bezeichnet, einer Kombination aus stammbetonter Adipositas, Fettstoffwechselstörung, Hyperurikämie, essentieller Hypertonie und gestörter Glukosetoleranz. Ursächlich findet sich eine Insulinresistenz insulinabhängiger Gewebe, sodass erhöhte Insulinspiegel erforderlich werden. Diese wiederum fördern das Hungergefühl und damit auch die Hyperalimentation. Ist die Bildungskapazität der β -Zellen für das Hormon erschöpft, manifestiert sich der Typ 2 D.m.. Erstes therapeutisches Angriffsziel muss also die Beseitigung der Überernährung und Adipositas sein, um durch sinkende Insulinspiegel wieder die Rezeptordichte zu erhöhen.

Die Klinik des manifesten Diabetes mellitus ergibt sich aus der Rolle des Insulin-Hormons: Das Insulin wird in den β -Zellen, die sich in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas befinden, gebildet und entsprechend des Blutglukosespiegels in das Blut sezerniert. Insulin hat zwei wesentliche Wirkmechanismen: Sein *Membraneffekt* fördert die Aufnahme von Glukose, Kalium und Aminosäuren in Muskel- und Fettzellen. Der *Stoffwechseleffekt* fördert die anabolen Prozesse wie Glykogen-, Lipid- und Proteinsynthese und hemmt die katabolen. Fehlen diese Wirkungen, so kann Glukose nur erschwert in die Zellen gelangen, die Triglyzeridsynthese ist durch Fehlen des Glycerinphosphats gehemmt und die freien Fettsäuren werden in der Leber zu Ketonkörpern abgebaut. Diese führen zur Anhäufung saurer Valenzen im Blut und zur Einschränkung der Pufferkapazität.

Die Entwicklung des Typ 1 D.m. verläuft meist schnell, während sich der Typ 2 schleichend entwickelt und oft erst bei Blutzucker-Bestimmungen im Rahmen von Routineuntersuchungen auffällt. Unspezifische Allgemeinsymptome sind Müdigkeit und Leistungsminderung. Besonders beim Typ 2 D.m. kommt es durch Hyperinsulinismus zu Hypoglykämien mit Heißhunger, Schwitzen und Kopfschmerzen. Durch Hyperglykämie entstehen Glukosurie mit osmotischer Diurese; die Symptome sind Polyurie, Durst, Polydipsie und Gewichtsverlust. Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes führen zu Wadenkrämpfen und Sehstörungen. Gefürchtet sind, neben den akuten Komplikationen wie dem ketoazidotischen (Typ 1) und dem hyperosmolaren (Typ 2) Koma, insbesondere die Spätschäden des Diabetes mellitus. Dieses sind in erster Linie die Mikro- und die Makroangiopathie (*Rosenstock et al. 1988*). Die Diabetes-spezifische Mikroangiopathie entsteht durch die Glykosylierung von Basalmembranproteinen durch den erhöhten BZ. Die Folgen sind eine Glomerulosklerose der Niere, eine Retino- und Neuropathie. Die

Makroangiopathie führt zu koronarer Herzkrankheit und anderen arterielle Verschlusskrankheiten.

Entscheidender diagnostischer Test zur Feststellung eines manifesten Diabetes mellitus ist die Bestimmung der Nüchternplasmaglukose, nach einer Periode von acht Stunden ohne Nahrungsaufnahme. Ein Wert $\geq 126 \text{ mg/dl}$ ($\geq 7.0 \text{ mmol/l}$) gilt als pathologisch. Auch beim Nachweis von Glukose im Urin, der meist erst ab Blutglukosespiegeln von $150\text{-}180 \text{ mg/dl}$, der so genannten Nierenschwelle, gelingt, liegt in aller Regel ein D. m. vor. Es gibt auch die physiologische Variante einer reduzierten Nierenschwelle, bei der bei normalen Blutglukosespiegeln Glukose im Urin nachgewiesen werden kann. Im Einzelfall sollte beim Nachweis von Glucose im Urin eine entsprechende Kontrolle der Spiegel im Blut erfolgen.

Die Therapie des manifesten D.m. besteht aus einer Kombination von Diät, körperlicher Aktivität (um die Sensitivität der Muskeln für Insulin zu erhöhen), Medikamenten (orale Antidiabetika und Insulin), einer guten Patientenschulung und -führung, sowie dem rechtzeitigen Erkennen und Behandeln von Komplikationen.

Beim Typ 2, dem nicht insulinpflichtigen D.m., erfolgt der Aufbau der Therapie zur Normalisierung der Blutglukose stufenweise: Diätetische Gewichtsnormalisierung genießt Priorität, es folgen orale Antidiabetika (z.B.: α -Glukosidasehemmer, Füll- und Quellstoffe, Metformin, Glitazone, Glinide und Sulfonylharnstoffe) und bei deren Versagen schließlich die Applikation von Insulin (s.c. oder unter stationären Bedingungen auch i.v.).

Der Typ 1 D.m. ist bei Manifestation insulinpflichtig. Die Substitution des fehlenden Hormons, nach dem Untergang der β -Zellen, ist unerlässlich, kann aber nach verschiedenen Schemata erfolgen. Die intensivierte Therapie nach dem Basis-/Bolus-Prinzip ist eine der natürlichen Insulinsekretion gut angenäherte Form. Zukünftige diabetologische Ziele sind jedoch zum einen die Erkennung und Behandlung der Ursachen, z.B. durch Aufhalten der β -Zellzerstörung und zum anderen die der Physiologie am ehesten entsprechende Substitution des fehlenden Insulins.

1.2 Die Pathogenese des Typ 1 D.m.

1.2.1 Genetische Prädisposition und Auslösfaktoren

Die im Abschnitt 1.1 geschilderte familiäre Häufung des IDDM lässt auf eine genetische Prädisposition für diese Erkrankung schließen. Zunächst wurde eine Häufung für bestimmte MHCs erkannt (*McLaren et al. 1989*). Der Major Histocompatibility Complex, MHC, wurde im Rahmen der Transplantationsforschung zuerst auf Leukozyten entdeckt und daher auch *Human Leucocyte Antigen*, HLA, genannt. Es ist ein Glykoprotein auf den Zellmembranen, das die Erkennung körpereigener und fremder Strukturen ermöglicht, sowie eine Schlüsselrolle im Immungeschehen spielt. Bei nicht-verwandten Menschen sind diese Strukturen nur sehr selten identisch. Es werden 3 Klassen von MHCs unterschieden, von denen insbesondere Klasse I und II bedeutsam sind. MHC-Klasse I kommt auf allen Zellen des Organismus vor. Er dient den Immunzellen zur Erkennung des eigenen Gewebes, da es interindividuell, wie erwähnt, meist verschieden ist. Zudem präsentiert es zytotoxischen T-Lymphozyten von Zellen synthetisierte Proteine als Antigene, um diese auf Schadhafteit, z.B. im Sinne einer Virusinfektion, zu überprüfen. MHC-Klasse II kommt in erster Linie auf Antigen Präsentierenden Zellen, APCs, des Immunsystems vor. Hierzu zählen Makrophagen und dendritische Zellen, aber auch B-Lymphozyten. $IFN\gamma$ kann MHC-Klasse II aber auch in anderen Zellen induzieren und exprimieren. Ihre Aufgabe liegt in der Antigenpräsentation und der Interaktion mit den T-Helferzellen. Die Gene, die den MHC-Komplex beim Menschen kodieren liegen auf Chromosom 6p. Für den Typ 1 D.m. ließ sich eine über 90%ige Assoziation mit den MHC-Merkmalen DR3 und/oder DR4 der MHC-Klasse II feststellen.

Wie in 1.1 erwähnt, wird eine polygene Vererbung für den D.m. vermutet. Eine Reihe von Genloci auf verschiedenen Chromosomen können mit der Entstehung des IDDM in Verbindung gebracht werden. Ursprünglich wurde angenommen, dass IL-18 in einer solchen Region kodiert wird (*Rothe 1997*). Mittlerweile wurde festgestellt, dass es auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q22.2-22.3) in enger Verbindung zu DRD2 aber getrennt von den IDDM loci kodiert wird (*Nolan K.F. 1998*).

Wie in den folgenden Abschnitten erläutert wird, ist der Typ 1 D.m. ein Krankheitsbild, das durch einen immunologischen Vorgang entsteht. Die Infiltration Langerhans'scher Inseln durch Zellen des Abwehrsystems und die Manifestation des D.m. werden mit Virusinfektionen in Verbindung gebracht. Infektionen um den Zeitpunkt der Manifestation

beschleunigen diese wahrscheinlich jedoch nur, da die eigentliche Zerstörung der β -Zellen durch Infiltration der Inseln mit Immunzellen schon Jahre vorher stattfindet. Möglicherweise spielen aber auch in dieser frühen Phase Virusinfektionen, Nahrungsbestandteile oder Impfungen eine Rolle (*Kolb H. et al. 1995*).

Trotz der in den letzten Jahren zunehmend erforschten Bedeutung von Umwelt- und Ernährungsfaktoren bei der Entstehung und Manifestation des D.m., tritt dieser vermutlich auch beim Menschen, wie in den beiden häufig verwendeten und anerkannten Tiermodellen BB-Ratte und NOD-Maus, spontan auf.

1.2.2 Tiermodelle des Typ 1 D.m.

Da es nur sehr wenige Untersuchungen am Menschen über die Entwicklung des IDDM gibt, waren es in den letzten beiden Jahrzehnten neben in-vitro-Analysen im wesentlichen Tiermodelle, die zum Verständnis der Pathogenese beitrugen und die Durchführung von Experimenten in vivo ermöglichten. Ihre Ähnlichkeit mit dem humanen Typ 1 D.m. lässt Rückschlüsse auf dessen Entstehung und Beeinflussbarkeit zu.

Zwei Modelle mit spontan auftretendem IDDM sind die BB-Ratte und die NOD-Maus. Mitte der 70er Jahre wurde in den BioBreeding Laboratories (daher die Bezeichnung *BB*) in Ottawa/Kanada eine spontane akut diabetische Wistar-Ratte entdeckt, die durch Bruder-Schwester-Kreuzung zu einem spontan diabetischen Tiermodell ingezüchtet wurde. Anders als bei der NOD-Maus kommt es geschlechtsunabhängig zu einer 60-70%igen Manifestation des IDDM in Form einer Hyperglykämie und Ketoazidose. Ohne Insulinzufuhr versterben die Tiere innerhalb weniger Tage.

Die NOD-Maus, für *Non Obese Diabetes*, wurde 1974 in Japan in einem Tiermodell für Katarakte entdeckt und dann als Modell für den Typ 1 D.m. etabliert (*Makino et al. 1979*). Die Diabetes-Inzidenz der Tiere liegt bei 0% im Alter von 80 Tagen und bei über 90% im Alter von 250 Tagen. Dies gilt nur für die weiblichen Mäuse, die männlichen entwickeln im gleichen Zeitraum in nur 20% der Fälle einen manifesten Diabetes. Dennoch lässt sich geschlechtsunabhängig bei fast allen Tieren im Alter zwischen 2 und 6 Wochen eine schwere Insulitis feststellen, die bei den meisten männlichen Tieren jedoch nicht zur Zerstörung der Inseln führt (*Kolb H. 1987*). Diese Beobachtung führte zur Entdeckung zweier unterschiedlicher Formen der Insulitis, die auch bei den weiblichen Tieren

auftreten: Zunächst kommt es zu einer periinsulären Infiltration der Inseln, bei der sich überwiegend das Zytokin IL-4 nachweisen lässt. Trotz deutlicher Präsenz der Immunzellen, kommt es nicht zu einer Zerstörung der pankreatischen β -Zellen. Nach einer bestimmten Zeit kann diese benigne Insulitis abklingen oder in die zweite Form, die aggressiv-destruierende, übergehen. Bei dieser lassen sich IFN γ und induzierbare NO-Synthase, iNOS, nachweisen. Das Endstadium ist die Zerstörung der β -Zellen und die Manifestation des Diabetes (Rothe et al. 1994). Der Grund für die Umschaltung zwischen den unterschiedlichen Insulitisformen ist in der Dominanz jeweils unterschiedlicher T-Helferzell-Subpopulationen zu sehen, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird. Cyclophosphamid scheint störend in dieses Gleichgewicht eingreifen zu können und eine verstärkte Th1-Reaktion zu bewirken (Harada et al. 1994). Verabreicht man NOD-Mäusen die Substanz als einmalige Gabe, kann die Dauer bis zur Diabetes-Manifestation verkürzt werden und der Anteil erkrankter männlicher Tiere steigt deutlich an. Die Gabe von Cyclophosphamid kann somit auch zur Synchronisierung des Diabetesgeschehens in einer Tiergruppe verwendet werden.

Wie eingangs erwähnt, sind beide Tiermodelle dem Verlauf des menschlichen Typ 1 D.m. sehr ähnlich. Bei beiden findet sich die Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit mononukleären Zellen und die Zerstörung der pankreatischen β -Zellen mit Manifestation des D.m.. Ebenso besteht eine Häufung gewisser MHC-Klasse II-Haplotypen hinsichtlich der Suszeptibilität für die Erkrankung. Bei der NOD-Maus werden noch mindestens 16 weitere Genloci mit *idd* Risikogenen für die polygene Erbllichkeit diskutiert., die nicht im Bereich MHC-kodierender Genen liegen (Archa-Orbea et al. 1987; Wicker et al. 1995; Serezee et al. 1994). Wie bereits erwähnt gehört auch *idd2* mit seiner Beziehung zum IL-18 zu dieser Gruppe.

1.2.3 Die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese des Typ 1 D.m.

Die Entdeckung der Inseln des Pankreas durch Langerhans datiert bereits in das 19. Jahrhundert; ihre Bedeutung wurde erst später geklärt. Während der Großteil des Pankreas exokrine Funktion hat, also an der Verdauung beteiligte Fermente in den Gastrointestinaltrakt sezerniert, sind die Inseln endokrin aktiv; sie geben Hormone in das Blut ab. 60-80% der hormonaktiven Zellen der Langerhans'schen Inseln sind β -Zellen, die

das Insulin produzieren, dessen Bedeutung in 1.1 beschrieben wurde. Hinzu kommen α -Zellen, die das insulin-antagonistische Glukagon bilden, sowie δ -Zellen mit Somatostatin und Zellen, die das Pankreatische Polypeptid PP produzieren.

Beim Typ 1 D.m. führt die Zerstörung der β -Zellen zur Manifestation des Diabetes, jedoch erst, wenn 90% der Zellen zerstört sind und der verbleibende Rest keine ausreichende Hormonproduktion mehr gewährleisten kann. Das Hauptmanifestationsalter liegt in der Pubertät, der Zerstörungsprozess scheint aber bereits in den ersten Lebensjahren zu beginnen (*Gepts et al. 1987; Rossini et al. 1985*).

Erste Beschreibungen dieses Prozesses durch Meyenburg gehen bereits auf das Jahr 1940 zurück, mit der Entdeckung mononukleärer Infiltrate in den Langerhans'schen Inseln. Diese als Insulitis bezeichnete Infiltration der Inseln durch Entzündungszellen wird als Mechanismus der Zerstörung angesehen. Trotz nachgewiesener möglicher viraler Infektion in der frühen Kindheit, sowie zum Zeitpunkt der Manifestation (1.2.1), wird die Pathogenese des Typ 1 D.m. heute als autoimmuner Entzündungsvorgang mit immunvermittelter Zerstörung der β -Zellen angesehen (*Castano et al. 1990; Rossini et al. 1985*). Der Untergang der β -Zellen ist spezifisch, die anderen hormonproduzierenden Zellen der Inseln bleiben unberührt. Dieses Phänomen bietet zwei ursächliche Erklärungen: Entweder sind die β -Zellen der Betroffenen so verändert, dass das Immunsystem sie als fremd ansieht oder das Immunsystem selbst ist verändert, sodass es die normalen β -Zellen angreift.

Inselzelltransplantationen und Lymphozytentransfers in den 80er Jahren legen intakte β -Zellen bei einem autoreaktiven Immunsystem nahe (*Prowse et al. 1986; Koevary al. 1983*). Die These des Typ 1 D.m. als Autoimmunerkrankung konnte durch den Nachweis typischer pathogenetischer Komponenten dieser Erkrankungen untermauert werden, die als "Autoimmunphänomene" bezeichnet werden:

Die Übertragbarkeit der Krankheit auf einen gesunden Organismus durch den Transfer von Immunzellen eines Erkrankten; die Abstoßung syngener Inselzelltransplantationen die nicht durch eine host-versus-graft-Reaktion erklärt werden kann; die Bildung von autoreaktiven T-Lymphozyten und Antikörpern; die Beeinflussbarkeit durch Immunsuppressiva.

Klinisch manifest wird der Diabetes, wenn nur noch 10% an β -Zellen verblieben sind, die schließlich auch noch zerstört werden. Da damit die Antigene verloren gehen, die zur

Autoaggression führen, brennt die Immunreaktion aus und zurück bleiben infiltratfreie fibrosierte Langerhans'sche Inseln (Kolb H. 1990/1995).

Obwohl Insulin zur Substitution aus Rindern und Schweinen und seit den 80er Jahren auch als rekombinantes humanes Hormon zur Verfügung steht, ist der Typ 1 D.m. auch heute noch eine chronische Erkrankung, mit den folgenschweren in 1.1 beschriebene Komplikationen. Zwar werden die Therapieprotokolle der natürlichen Inkretion des Insulins so gut wie möglich angepasst, doch gründet sich die Hoffnung auf eine mögliche kausale Behandlung im wesentlichen auf die Erforschung der immunologischen Mechanismen, die dieser Erkrankung zugrunde liegen. Zudem lässt sich vielleicht auch ein Einblick in Pathogenese anderer immunogener Prozesse, die in Assoziation mit dem Typ 1 D.m. auftreten, etwa in der Schilddrüse und der Nebenniere, gewinnen (Riley et al. 1982).

1.2.4 Humorale und zelluläre Immunität

Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, ist die Produktion von Antikörpern gegen körpereigene Strukturen ein wesentliches Phänomen von Autoimmunerkrankungen.

Auch beim manifesten IDDM lassen sich in bis zu 90% der Fälle verschiedene Antikörper nachweisen (Kolb H. et al. 1983): ICA, Inselzellantikörper; IAA, Insulinautoantikörper; ICSEA, Inselzell-Oberflächenantikörper; GADA, Antikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase der β -Zelle; IA-2A, Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase IA-2; sowie PAA, Proinsulinantikörper. ICA und IAA sind bereits Jahre vor Manifestation des Diabetes nachweisbar und dies besonders häufig in Gruppen mit genetischem Risiko für die Erkrankung. Auch GADA und PAA sind frühzeitig nachweisbar. Diese Marker werden heute zur Screening-Untersuchung von Risikogruppen herangezogen (Kuglin et al. 1989; Roll et al. 1997). Unter Berücksichtigung des Alters der Patienten und einem i.v.-Glukosetoleranztest lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer Manifestation in den nächsten 5 Jahren beurteilen.

Obwohl es verschiedene Antikörper gegen Strukturen der β -Zellen gibt, scheinen sie keine kausale Bedeutung für den autoimmunen Prozess zu haben: Es ist weder möglich, mittels Serum-Übertragung auf gesunde Tiere eine Zerstörung der Inseln oder einen Diabetes zu induzieren, noch konnte die Separation von B-Lymphozyten die aggressive Insulitis und die Manifestation der Erkrankung in betroffenen Tieren verhindern (Kolb H. et al. 1995).

Pathogenetisch bedeutsamer scheinen die T-Lymphozyten zu sein. In den beiden Tiermodellen konnte die Übertragung von T-Helferzellen auf T-Zell-depletierte Mäuse eine Insulinitis und einen Diabetes induzieren (*Haskins et al. 1990; Miller et al. 1988*). Auch beim Menschen scheint dieser Mechanismus zugrunde zu liegen: Aus dem Blut frisch manifester Diabetiker konnten T-Lymphozyten isoliert werden, die auf das Autoantigen *ICA 69* mit Zellproliferation reagierten (*Roep et al. 1991/1996*).

Es gibt eine humorale Komponente der Autoimmunität im IDDM mit einer Reihe unterschiedlicher Antikörper. In der Pathogenese der Erkrankung scheint diese eine den zellulären Vorgängen untergeordnete Rolle zu spielen. Ihre klinische Bedeutung liegt im Screening von prädisponierten Familien und in der Kalkulation des Risikos. Mit dem Ausbrennen der Insulinitis geht auch ein Rückgang der Antikörpertiter einher.

1.2.5 APCs - Antigen Präsentierende Zellen

Unter der Bezeichnung *APC*, Antigen Präsentierende Zellen, versteht man neben Makrophagen und dendritischen Zellen auch B-Lymphozyten. *APCs*, insbesondere Makrophagen, sind die ersten Insel-infiltrierenden Zellen, danach folgen T- und schließlich B-Lymphozyten (*Hanenberg et al. 1989; Lee et al. 1989; Ziegler et al. 1992; Jansen et al. 1994*). Ihnen kommt eine Schlüsselfunktion in der Immunantwort zu. Dies konnte durch den Einsatz von Antikörpern und Makrophagen-toxischem Silika gezeigt werden. Durch die so bewirkte Elimination der Makrophagen, bleibt die Diabetes-Entwicklung im Tiermodell aus (*Hutchings et al 1989; Oschiliwski et al. 1985; Carlton et al. 1988*).

Zum einen bewirkt die Antigenpräsentation mit gleichzeitiger Sezernierung immunregulatorischer Lymphokine eine Beeinflussung der T-Lymphozyten und damit eine Steuerung der Immunantwort von Toleranz bis Aggressivität. Zum anderen sind die Makrophagen maßgeblich am β -Zell-Untergang beteiligt, ihre Übertragung kann eine Diabetesentstehung auslösen.

1.2.5.1 Der Einfluss der APCs auf die T-Lymphozyten

Nach der Bildung im Knochenmark und ihrer Passage durch die Blutzirkulation wandert ein Großteil der Makrophagen in das Gewebe. Dort nehmen die Zellen ständig Antigene ihrer Umgebung auf, prozessieren diese in Zellorganellen wie Lysosomen und präsentieren die entstandenen kurzen Bruchstücke in Verbindung mit ihrem MHC-Klasse II Komplex auf der Zelloberfläche. Die CD-4 Rezeptoren der T-Helferzellen erkennen diese Verbindung und treten mit den Makrophagen in Kontakt, wobei eine Reihe unterschiedlicher Rezeptoren stabilisierende Verbindung eingeht. Neben dem direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen APC und T-Helferzelle sind weitere Signale zur Aktivierung der T-Helferzellen und der Immunreaktion notwendig. Dies sind zum einen IL-1 und TNF α (Germann *et al.* 1990; Weaver *et al.* 1990). Eine erhöhte Expression der beiden Stoffe ist für die Typ 1 D.m. Tiermodelle, die NOD-Maus und die BB-Ratte beschrieben, was eine abnorme T-Helferzell-Reaktion erklären könnte (Rothe *et al.* 1990). Zum anderen sind es IL-12 und IL-18, der Interferon γ induzierende Faktor, die eine proinflammatorische Wirkung besitzen (Manetti *et al.* 1993; Alfoso *et al.* 1994; Trembleau *et al.* 1995; Okamura *et al.* 1994), indem sie zur Aktivierung von T-Helferzellen mit einer Differenzierung zu Th1-Zellen führen (siehe auch 1.2.6). Neben diesen proinflammatorischen können Makrophagen auch antiinflammatorische Signale abgeben. Sie tun dies am Ende einer Immunantwort, vielleicht auch anstelle einer aggressiven Reaktion. Antiinflammatorisch wirken insbesondere IL-10 und TGF β , die beide der Selbstregulierung der Makrophagen dienen (De Waal *et al.* 1991; Fiorentino *et al.* 1991; Bogdan *et al.* 1991; Jun *et al.* 1995).

1.2.5.2 Die Rolle der APCs bei der β -Zell-Zerstörung

Neben der Aktivierung der T-Helferzellen und der damit verbundenen Auslösung einer Immunantwort, sind die APCs, in erster Linie die Makrophagen, selbst an der Zerstörung der pankreatischen β -Zellen beteiligt. In vitro sind Makrophagen β -Zell-zytotoxisch (Appels *et al.* 1989). Einige Mechanismen dieser Zerstörung sind bereits untersucht. Sie erfolgt vermutlich durch lösliche Substanzen, da ein Kontakt der Zellen nicht

nachgewiesen werden konnte (Kolb-Bachhofen et al. 1989). So sind die beiden im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Zytokine in höheren Dosen direkt zytotoxisch: IL-1 über die Bildung freier Radikale und TNF α unter anderem über eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität. Potenziert wird die Wirkung der beiden Zytokine durch IFN γ (Mandrup-Poulsen et al. 1986; Pukel et al. 1988). IL-18 hingegen scheint keinen direkten zytotoxischen Einfluss ausüben zu können (Rothe H. 1999).

Als einer der wesentlichen Effektoren der Zytotoxizität konnte das Stickstoffmonoxid, NO, identifiziert werden (Kolb H. 1991). NO ist ein in vielen Zellen durch NO-Synthase hergestelltes Molekül mit physiologischen Funktionen. In den Makrophagen ist es die induzierbare NO-Synthase, iNOS, die durch Stimulation verstärkt exprimiert werden kann und hohe Dosen NO zur Verfügung stellt (Moncada et al. 1991). Diese sind für die Zytotoxizität gegen die β -Zellen verantwortlich (Kröncke et al. 1993; Radons et al. 1994). Der Mechanismus der Zerstörung beruht auf NO-induzierten Brüchen des DNA-Strangs (Fehsel et al. 1993). Nach einem ähnlichen Prinzip tragen weitere Makrophagenprodukte zur Schädigung der β -Zellen bei, in erster Linie sind dies Sauerstoffradikale, die DNA-Schäden verursachen (Horio et al. 1994).

iNOS ist nicht nur durch IL-1 und TNF α , sondern auch durch IFN γ stimulierbar. Im Tiermodell der NOD-Maus konnte gezeigt werden, dass es die Menge an IFN γ ist, die die induzierte Menge an NO-Synthase bestimmt und damit auch die Fähigkeit der Makrophagen die β -Zellen zu zerstören oder nicht (Kolb H. 1992; Spinas 1986/87; Cetkovic-Cvrlje 1994; Burkart 1996).

1.2.6 T-Lymphozyten und Zytokine

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten erläutert wurde, kommt den T-Lymphozyten eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese des Typ 1 D.m. zu. Auf den Transfer dieser Zellen gehen auch die ersten Erkenntnisse über die zellulären immunologischen Prozesse im Tiermodell zurück. Die Erkrankung erwies sich als übertragbar durch den Transfer von T-Lymphozyten erkrankter NOD-Mäuse in thymuslose Tiere. Damit wurde der Zusammenhang der Erkrankung mit einer Reihe von Störungen dieser Immunzellen entdeckt (Kolb H. et al. 1987).

Die T-Lymphozyten lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen: CD-8 positive zytotoxische T-Zellen und CD-4 positive T-Helferzellen. Heute werden insbesondere die CD-4 positiven T-Helferzellen als wesentlich in der Pathogenese des IDDM angesehen. Es wurde gezeigt, dass durch ihren Transfer in T-Zell-depletierte Mäuse die Erkrankung übertragbar ist, nicht aber durch den von CD-8 positiven Zellen (*Haskins et al. 1990; Miller et al. 1988; Thivolet et al. 1991*). T-Helferzellen sind mengenmäßig die dominierenden Zellen des Infiltrats bei der Insulitis (*Kolb H. et al. 1995*). Sie treten mit den APCs in Kontakt und beide Zellarten nehmen wechselseitig durch die Sezernierung von Zytokinen Einfluss aufeinander. Wie im Absatz 1.2.5.1 bereits erläutert, erfolgt die Aktivierung der T-Helferzellen durch Interaktion mit dem an MHC-Klasse II Komplex assoziierten Antigen auf der Oberfläche der APCs. Zusätzlich zu diesem Kontakt ist als Kostimulanz die Sezernierung von Zytokinen notwendig. Wesentlich zum Verständnis dieser Aktivierungsvorgänge und den immunologischen Abläufen beigetragen, hat die Klassifizierung von T-Helferzell-Subpopulationen (*Mosmann et al. 1986*): Die T-Helferzellen lassen sich in drei Gruppen einteilen, solche vom Typ 0, *Th0*, vom Typ 1, *Th1* und vom Typ 2, *Th2*. Unterschieden werden die Zellen unter anderem durch die Zytokine, die sie sezernieren. *Th0*-Zellen sind nicht spezifisch und gelten als Vorläufer der beiden anderen Typen. *Th1*-Zellen sezernieren IL-2, TNF α und IFN γ ; sie scheinen eine besondere Rolle bei der zellvermittelten Immunität und der Abwehr intrazellulärer Pathogene zu spielen (*Cher et al. 1987*). Dominierende Zytokine der *Th2*-Zellen sind IL-4 und IL-10; diese Zellen scheinen wesentliche Bedeutung für die humorale Abwehr zu haben.

Die unterschiedlichen Zytokine der T-Helferzellen dienen nicht nur der Identifizierung dieser, sondern bedeuten auch unterschiedliche Wirkungsweisen, mit autokriner Stimulation und Hemmung der jeweils anderen Subpopulation (*Mosmann et al. 1989*).

Die Differenzierung in den jeweiligen Typ der T-Helferzelle wird durch Makrophagen Zytokine beeinflusst, die rückwirkend wiederum durch die Sekretion der T-Zellen beeinflusst werden. Die Störung des Gleichgewichts zwischen *Th1*- und *Th2*-Zellen wird heute als wesentlicher pathogenetischer Mechanismus des IDDM angesehen. Der Diabetes der NOD-Maus scheint das Resultat eines Überwiegens der *Th1*-Zellen zu sein (*Rabinovitch et al. 1994*). Dies bedeutet, dass die Dominanz der *Th1*-Zellen und ihrer Zytokine mit einer aggressiven Intransulitis, der Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und der Diabetes-Manifestation einhergeht, während die *Th2*-Zellen bei der nicht-

destruierenden Periinsulinitis dominieren (Rothe et al. 1994; Rabinovitch et al. 1994; Katz et al. 1995; Healey et al. 1995; Radons et al. 1997).

Erkenntnisse über die Wirkungsweisen der unterschiedlichen Zytokine haben einen Einblick in die komplexen Regelabläufe der Immunantwort gegeben: Die Differenzierung der Th0- in eine Th1- oder Th2-Zelle hängt im wesentlichen von der Bindung an die APC und dem kostimulatorisch-sezernierten Zytokin ab.

IL-12 und IL-18 führen zu einer Differenzierung zur Th1-Zelle (Manetti et al. 1993; Alfoso et al. 1994; Trembleau et al. 1995; Okamura et al. 1994). Die potente Th1 fördernde Form des IL-12 ist ein heterodimeres Molekül, das *IL-12p70*, bestehend aus zwei Ketten, p35 und p40. Die p40-Kette ist allerdings auch in der Lage, sich als homodimeres Molekül zu formieren und an den T-Helferzell-Rezeptor für IL-12 zu binden. Es kommt dann zu einer Hemmung der IFN γ -Produktion der Th1-Zellen (Mattner et al. 1993; Gillessen et al. 1995).

Auf IL-18, auch als *IGIF* für *Interferon Gamma Induzierender Faktor* bezeichnet, das eine dem IL-12 vergleichbare Th1-fördernde Wirkung hat, wird im Abschnitt 1.3, "Ziel der Arbeit", näher eingegangen.

Die Differenzierung zur Th1-Zelle hat, wie oben erwähnt, eine Verschiebung der T-Helferzell-Balance zur aggressiven Seite zur Folge. Neben IL-2 und TNF α ist dafür insbesondere das IFN γ verantwortlich, mit seinem wesentlichen Einfluss auf die Art der Makrophagenaktivität:

IFN γ aktiviert die Antigenpräsentation der Makrophagen und fördert deren Reifung (Allen et al. 1987). Es führt zu einer verstärkten Expression des TNF α in Makrophagen, der wiederum die induzierbare NO-Synthase iNOS stimuliert. Das IFN γ der Th1-Zellen fördert also die Bildung β -Zell-toxischer NO Dosen (Sher et al. 1992; Corbett et al. 1991). Die in 1.2.5.1 erwähnten antiinflammatorischen Makrophagenprodukte IL-10 und TGF β , die die iNOS hemmen, werden durch IFN γ supprimiert (Chomarat et al. 1993). IFN γ fördert zudem autokrin die weitere Differenzierung von Th1-Zellen und hemmt die Bildung von Th2-Zellen (Mosmann et al. 1991).

Die IFN γ -Produktion der Th1-Zellen ist ein wichtiger Effektor in der immunogenen Pathogenese des IDDM. Diese Feststellung konnte durch eine Verhinderung der β -Zell-Zerstörung und der Diabetes-Manifestation durch die Gabe von Antikörpern gegen IFN γ in vivo untermauert werden (Nicoletti et al. 1990).

Die Zytokine IL-4 und IL-10 führen zu einer Differenzierung zur Th2-Zelle. Insbesondere IL-10 scheint einen entscheidenden Einfluss zu haben. Wie in 1.2.5.1 erwähnt, dient es der Autoregulation der Makrophagen, indem es verzögert bei einer Immunantwort freigesetzt wird (*Jun et al. 1995*). Es wirkt sich hemmend auf die IL-1-, IL-12- und TNF α -Produktion der Makrophagen aus (*Tripp et al. 1993; D'Andrea 1993*), unterdrückt deren MHC-Klasse II Expression und damit die weitere Antigenpräsentation (*De Waal et al. 1991*). Dies ist nicht der einzige IFN γ -antagonistische Effekt, den es besitzt. Es verhindert die oben geschilderte autokrine Stimulierung zur weiteren Differenzierung von Th1-Zellen durch IFN γ . Auch die Wirkung von IFN γ auf TNF α und die damit verbundene verstärkte Expression von iNOS wird blockiert (*Sher et al. 1992*). IL-4 und IL-10 sind zugleich auch die kennzeichnenden Zytokine der Th2-Zellen und wirken so zusätzlich auf Makrophagen und Th1-Zellen.

IL-4 hemmt die IFN γ -Produktion der Th1-Zellen und wirkt autokrin stimulierend auf die weitere Differenzierung von Th2-Zellen (*Liew et al. 1989*). Es potenziert durch seine Interaktion mit IL-10 dessen inhibitorischen Effekt auf die weitere Differenzierung von Th1-Zellen (*Powrie et al. 1993*). Die besondere Bedeutung des IL-10 im Sinne einer antiinflammatorischen Substanz konnte durch die Applikation des rekombinanten Zytokins im Tiermodell unterstützt werden. Es verhindert, wie auch die Antikörper gegen IFN γ , eine Inselzellzerstörung und die Diabetes-Manifestation (*Pennline et al. 1994*).

In dem komplexen Regelwerk der Zytokine zwischen APCs, Th1- und Th2-Zellen, sowie zwischen T-Helferzell-Subpopulationen, sind IL-10 und IFN γ zwei wichtige Antagonisten. IFN γ steht für eine Verschiebung des Gleichgewichts zu den Th1-Zellen, mit einer aggressiven Insulitis und der Diabetes-Manifestation. IL-10 verschiebt die Balance auf die Th2-Seite, mit einer nicht-destruierenden Insulitis und antiinflammatorischem Einfluss. Beide Zytokine haben in ihrer möglichen Beeinflussbarkeit durch IL-18 im Rahmen dieser Versuche besondere Aufmerksamkeit erhalten.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Tiermodell der NOD-Maus, mit einem durch Cyclophosphamid akzelerierten und synchronisierten Diabetesverlauf, konnte gezeigt werden, dass die Expression des IL-18-

Gens frühzeitig im Pankreas und in der Peripherie hochreguliert wird (Rothe et al. 1997/ Rothe, Martin et al. 1997). Es wird von den APCs sezerniert und bewirkt wie IL-12 eine Differenzierung zur Th1-Zelle (siehe 1.2.6) und wird auch als *IGIF*, Interferon Gamma Induzierender Faktor, bezeichnet.

IL-18 ist ein Zytokin, das aus einer Kette besteht und strukturelle Ähnlichkeit mit IL-1 besitzt. IL-1 ist nicht nur ein potenter Entzündungsmediator in der Interaktion von APC und T-Helferzellen, sondern hat auch einen β -Zell-zytotoxischen Effekt, vermutlich wie TNF α über die Stimulierung der iNOS (Bazan et al. 1996; Bergmann L. 1992).

In vitro konnte bereits der Proliferationseffekt des IL-18 auf die Th1-Zellen nachgewiesen werden (Okamura et al. 1994; Micallef et al. 1996), es hatte dort jedoch keinen direkten zytotoxischen Effekt. Im MTT-Test, bei dem mittels photometrischer Bestimmung der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes *MTT* zu seinem Abbauprodukt Formazan die Funktionsfähigkeit der mitochondrialen Enzyme bestimmt wird, konnte die mitochondriale Aktivität nicht reduziert werden. Auch die NO-Produktion konnte weder durch alleinige Gabe von IL-18 noch in Kombination mit IL-1 oder TNF α gesteigert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von IL-18 in vivo, im Tiermodell der NOD-Maus, zu testen. Drei Schwerpunkte wurden dabei gewählt:

1.) Die Diabetes Inzidenz

Der Effekt der Applikation von IL-18 auf die klinische Manifestation des IDDM der NOD-Maus, die das Resultat der destruktiven Insulinitis darstellt, wurde untersucht.

2.) Die Histologie der Langerhans'schen Inseln

Die aggressive Th1-dominierte Intransulitis führt zur Zerstörung pankreatischer β -Zellen und zur Manifestation des IDDM, während die nicht-destruierende Th2-dominierte Periinsulitis dies nicht bewirkt. Die histologische Beurteilung der Pankreata sollte zeigen, ob die Behandlung mit IL-18 Einfluss auf das Ausmaß und die Art der Infiltration der Langerhans'schen Inseln nimmt.

3.) Das Zytokinmuster

Im Abschnitt 1.2.6 wurde auf das komplexe Wechselspiel der unterschiedlichen Zytokine eingegangen. Das von Makrophagen sezernierte IL-18 führt zur Differenzierung zur Th1-Zellen. Es wurde untersucht, welchen Einfluss das applizierte IL-18 auf die endogene IL-18 Produktion (durch Makrophagen), auf die Produktion von IL-12 und auf die Antagonisten IL-10 und IFN γ nimmt und wie es auf einen der wichtigsten Mechanismen der Makrophagen-Toxizität, die iNOS, den Marker für das Ausmaß der destruktiven Prozesse, wirkt.

Die Arbeitshypothese ist, dass die Applikation des proinflammatorischen Zytokins IL-18 zu einer Beschleunigung der Diabetes Entwicklung, zu einer aggressiven Intrainsulitis und zu einer Dominanz der Th 1-Zellen führen müsste.

2. Material

2.1 Versuchstiere

Für diese Experimente wurden zwei unterschiedliche Mäusestämme verwendet:

Diabetes-suszeptible weibliche NOD/Bom-Mäuse, die aus dem Bomholtgard Breeding Centre (Ry, Denmark) im Alter von 9 Wochen bezogen wurden. Deren mittlere Diabetes-Inzidenz beträgt 0% im Alter von 80 Tagen und $\geq 90\%$ im Alter von 250 Tagen.

Weibliche Balb/cHan Mäuse aus der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf/Germany), als Kontrolltiere.

2.2 Behandlungsmaterialien

- Standard-Diät der Versuchstiere: Sniff-Diet (Sniff, Soest/Deutschland) und Wasser "ad libitum".
- Ovalbumin, OVA/Grade VI der Firma Sigma (Deisenhofen/Deutschland)
- Rekombinantes IL-18 (Fujisaki Insitut, Fujisaka/Japan)

2.3 Geräte für histologische Methoden

- Frigocut 2800E/ Kryostat; Reichert-Jung/Leica (Nussloch/Deutschland)
- diverse Glasbehälter für die HE-Färbung
- Korkträger zum Einbetten des Gewebes
- Laborlux S/ Mikroskop; Leitz (Wetzlar/Deutschland)
- Objektträger, SuperFrost Plus; Menzel

2.4 Geräte für molekularbiologische Methoden

- Beta Shield Devices, Abschirmungen für radioaktive Strahlung; Stratagene (Heidelberg/Deutschland)

- Contamat, Geigerzähler; FAG (Linkenheim-Hochstetten/Deutschland)
- Direct Screen Instant Camera; Polaroid (Offenbach/Deutschland)
- DNA-Thermocycler, HYBAID OmniGene; MWG-Biotech (Ebersberg/Deutschland)
- Elektrophorese-Kammer horizontal; GibcoBRL (Eggenstein/Deutschland), sowie Spannungsquelle; Pharmacia (Freiburg i. Br./Deutschland.)
- Fujix BAS 1000; Raytest (Straubenhardt/Deutschland):
 - Bio-Imaging-Analyser
 - Imaging-Plate
 - Kassette für Imaging-Plate
- Gene-Quant, Photometer/RNA-DNA-Calculator; Pharmacia (Freiburg i. Br. /Deutschland)
- IKA-Ultra-Thurrax; Janke & Kunkel (Staufen i.Br. /Deutschland)
- Push-Columns, Reinigungssäulen; Stratagene (Heidelberg/Deutschland)
- UV-Durchsichtgerät TFP-20M; Vilber-Lourmat (Marne la Vallée/France)
- UV-Stratalinker 2400; Stratagene (Heidelberg/Deutschland)
- Wärme-Umwälzschrank; Bachofer (Reutlingen/Deutschland)

2.5 Laborgeräte (allgemein)

- Magnetdrehrührer Poly 15; Buddeberg (Mannheim/Deutschland)
- Mikrowellenofen Lunik 820; Samsung (Schwalbach/Deutschland)
- pH-Meter 27; Knick (Berlin/Deutschland)
- Pipettierhilfen; Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
- Thermomixer 5436; Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
- Vortex VF 2 IKA; Janke & Kunkel (Staufen i. Br. /Deutschland)
- Waagen: der Firma Sartorius (Göttingen/Deutschland)
 - Analytic A200S, Feinwaage
 - Laboratory LC4200
- Wasserbad; Köttermann Labortechnik (Uetze/Deutschland)
- Zentrifugen:
 - GS-15R Zentrifuge; Beckmann (Fullerton/USA)
 - Sorvall RC 5 C; DuPont (München/Deutschland)
 - Zentrifuge 5415C; Eppendorf (Hamburg/Deutschland)

2.6 Verbrauchsmaterial

- Diabur-Test 5000, Harnglukose Teststäbchen; Boehringer (Mannheim/Deutschland)
- Eppendorf-Caps, 2,0ml; Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
- Falcon-Tubes 15 und 50 ml; Greiner (Solingen/Deutschland)
- Filterpapier 3MM; Whatman (Bad Soden/Deutschland)
- Hybond N, RPN 203 N und Hybond N+, RPN 303B, Nylonmembranen; Amersham (Piscataway/USA)
- Kapillarpipetten, 20 µl; Hirschmann (Eberstadt/Deutschland)
- Nuc-Trap purification columns, Biogel P60; Stratagene (Heidelberg/Deutschland)
- PCR-Tubes, 0,5 ml; Biozyme (Hessisch Oldendorf/Deutschland)
- Pipetten-Spitzen; Eppendorf (Hamburg) und Abimed (Langenfeld/Deutschland)
- Filme 665EP für Direct Screen Instant Camera; Polaroid (Offenbach/Deutschland)

2.7 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

2.7.1 Chemikalien

- Aceton, Art-Nr: 1.00014; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Äther (Diethyläther), Art-Nr: 8810.1; Roth (Karlsruhe/Deutschland)
- Agarose: Qualex Gold, Art-Nr: 850092; AGS GmbH (Heidelberg/Deutschland)
- AluminiumKaliumSulfat-Dodecahydrat, Art-Nr: 1.01047.1; Merck (Darmstadt)
- Bromphenolblau, Art-Nr:15375; Serva (Heidelberg/Deutschland)
- Borsäure, Art-Nr: 5225689; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Chloralhydrat, Art-Nr: 1.02425.05; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Chloroform, Art-Nr: 1.02445; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- DEPC, Diethylpyrocarbonate, Art-Nr: 18835; Serva (Heidelberg/Deutschland)
- DTT, Dithiothreitol, 0,1 M, Art-Nr: 5108053; Gibco (Eggenstein/Deutschland)
- EDTA (Titriplex III), Art-Nr: 8418; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Einbettmedium für Gefrierschnitte, Art-Nr: W11676/A; Reichert-Jung (Nussloch/Deutschland)
- Eosin B/Certistain, Art-Nr: 15934; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Essigsäure, 100%, Art-Nr: 1.00063; Merck (Darmstadt/Deutschland)

- Ethanol, abs., Art-Nr: 1.00983; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Ethidiumbromid, 1%ige Lsg., Art-Nr: 21251; Serva (Heidelberg/Deutschland)
- Eukitt, Art-Nr: D1125; Kindler (Freiburg/Deutschland)
- Formaldehyd 37%, Art-Nr: F-1635; Sigma (Geisenhofen/Deutschland)
- Formamid (ultrapure), Art-Nr:15515; GibcoBRL (Eggenstein/Deutschland)
- Glycerin (86%iges Glycerol), Art-Nr: 7533; Roth (Karlsruhe/Deutschland)
- Guanidinthiocyanat, 99%, Art-Nr: 0017.2; Roth (Karlsruhe/Deutschland)
- Hämatoxylin, Art-Nr: 4302; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- HCl, 37%ig, Art-Nr: 1.13386; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Isopentan, Art-Nr: 3927; Roth (Karlsruhe/Deutschland)
- Isopropanol; Art-Nr: 9634; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- β -Mercaptoethanol, Art-Nr: 28625; Serva (Heidelberg/Deutschland)
- Mineralöl, Art-Nr: M-8410; Sigma (Geisenhofen/Deutschland)
- Na-citrat, Art-Nr: 71406; Fluka (Buchs/ Switzerland/Deutschland)
- NaCl, Art-Nr: ;Merck (Darmstadt/Deutschland)
- NaOH, Plättchen, Art-Nr: 6498; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Nariumacetat (-trihydrat), Art-Nr: 1.06267.5; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Natriumjodat, Art-Nr: 1.06525.01; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Natriumphosphat, Art-Nr: 1.06574.1; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Phenol, Art-Nr: A980.1; Roth (Karlsruhe/Deutschland)
- Saccharomyces cerevisiae Ansatz; Dr.Claus Stauder AG (Essen/Deutschland)
- Sarkosyl, N-Lauroylsarcosin-Natrium, Art-Nr: L-9150; Sigma (Geisenhofen/Deutschland)
- SDS, Art-Nr: 20760; Serva (Heidelberg/Deutschland)
- Tris (-Hydroxymethylaminomethan), Art-Nr: 4855; Roth (Karlsruhe/Deutschland)
- Xylencyanol, Art-Nr: 38505; Serva (Heidelberg/Deutschland)
- Xylol, Art-Nr: 1.08681; Merck (Darmstadt/Deutschland)
- Zitronensäure (Monohydrat), Art-Nr: 1.00244.05; Merck (Darmstadt/Deutschland)

2.7.2 Molekularbiologische Reagenzien

2.7.2.1 Allgemeine Reagenzien

- DNA-Ladder (1 Kb Stocklösung), Art-Nr: 15615-016; GibcoBRL (Eggenstein)

2.7.2.2 Primer:

Genspezifische Oligonukleotid-Primer/Maus; Konzentration: 10-15 pmol/ μ l

Die Primer mit der Referenz "Rothe" wurden bei der Firma Eurogentec (Seraing/Belgium) synthetisiert.

- β -Aktin, Referenz: Clontech Laboratories (Palo Alto/USA)

5'Primer-Sequenz: TCA TAG ATG GGC ACA GTG TG

3'Primer-Sequenz: CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG

- IFN γ , Referenz: Clontech Laboratories (Palo Alto/USA)

5'Primer-Sequenz: TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC

3'Primer-Sequenz: TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA AAC TTG GC

- IL-4, Referenz: Clontech Laboratories (Palo Alto/USA)

5'Primer-Sequenz: ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT

3'Primer-Sequenz: GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC

- IL-10, Referenz: Clontech Laboratories (Palo Alto/USA)

5'Primer-Sequenz: ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGTT

3'Primer-Sequenz: ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG GTTT

- IL-12p35, Referenz: Rothe, DFI Düsseldorf/Deutschland (*Rothe et al. 1997*)

5'Primer-Sequenz: GGA ACT ACA CAA GAA CGA GAG TTG C

3'Primer-Sequenz: ATC ACC CTG TTG ATG GTC ACG

- IL-12p40, Referenz: Rothe, DFI Düsseldorf/Deutschland (*Rothe et al. 1997*)

5'Primer-Sequenz: CCT AAG TGA TCC GCT ACA ATC

3'Primer-Sequenz: CTC TTT GAC AGT GAT GGT CAG

- iNOS, Referenz: Rothe, DFI Düsseldorf/Deutschland (*Rothe et al. 1994*)

5'Primer-Sequenz: TTG CCC CTG GAA GTT TCT CT

3'Primer-Sequenz: AAA ATC TCT CCA CTG CCC CA

2.7.2.3 Reverse Transcription-PCR

- SuperScript II Rnase H- Reverse Transkriptase-Kit , Art-Nr: 18064-014; Gibco BRL (Eggenstein/Deutschland):

- SuperScript II (Reverse Transcriptase)

- 5fach First Strand Buffer

- 0.1 M DTT

- 10mM dNTP-Mix (jeweils 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in neutralem pH),
(dNTP-Set (0.1M), Art-Nr: 1277049; Boehringer (Mannheim/Deutschland))
- RNAsin (RNase-Inhibitor)
- Oligo (dT)
- *Taq* DNA Polymerase-Kit, Art-Nr: 18038-026; GibcoBRL (Eggenstein/Deutschland)
 - *Taq* DNA Polymerase
 - 10fach PCR-Buffer minus Mg
 - 50 mM Magnesiumchlorid

2.7.2.4. Reagenzien zur Herstellung des radioaktiven Hybridisierungs-Labels

- Prime-It II Random Primer Labeling Kit, Art-Nr: 300385; Stratagene (Heidelberg):
 - Random 9-mer primers (gepufferte wässrige Lösung von Random-Oligodesoxyribonukleotiden, 27 OD Units/ml)
 - 5fach dATP-Puffer, wässrige Lösung mit jeweils 0.1 mM dCTP, dGTP und dTTP
 - Exo(-)-Klenow (5U/μl)
 - Stop-Mix (100μl 0.5 M EDTA, pH 8.0)
- [α -³²P]-dATP, Art-Nr: 39010X; ICN-Pharmaceuticals (Irvine/USA) Konzentration:
10mCi/ml

2.8. Lösungen und Puffer

- Church´s Buffer (Hybridisierungspuffer)
 - 1ml 0.5 M EDTA
 - 125ml 1 M Natriumphosphat
 - 175ml SDS 20%
- Denaturierungslösung:
 - 1.5 M NaCl
 - 0.5 M NaOH
 - in Aqua dest.
- DNA-Auftragspuffer, 6-fach:
 - 0.25g Bromphenolblau
 - 30g Glyzerin

0.25g Xylenzanol
in 100ml Aqua dest.

- Eosin Lösung:

2g Eosin
ad 500ml Ethanol 60%
zum Gebrauch: 1ml 100%ige Essigsäure zusetzen

- GTC- β -Mercaptoethanol:

10ml GTC-Puffer:
100g Guanidinthiozyanat
7ml 0.75 M Natriumzitat
10.6ml Sarkosyl 20%
mit 17.2ml Aqua dest.

72 μ l β -Mercaptoethanol

- Hämatoxylin-Lösung:

50g Aluminium-Kalium-Sulfat
50g Chloralhydrat
1g Hämatoxylin
0.2g Natriumjodat
1g Zitronensäure-Monohydrat
ad 1000ml Aqua dest.

- kb-Leiter:

40 μ l DNA-Auftragspuffer
20 μ l kb-Leiterstocklösung
180 μ l Aqua dest.

- Neutralisierungs-Lösung:

5 M NaCl
1.25 M Tris-HCl
in Aqua dest.

- RNA-Aufnahmepuffer, 10-fach:

165 μ l Formaldehyd
500 μ l Formamid
1ml TNAE

- ad 1ml Aqua dest.
- RNA-Auftragspuffer, 7-fach:
 - 0.4g Bromphenolblau
 - 1 mM EDTA
 - 50g Glycerin
 - 0.4g Xylenzylanol
 - in 100ml Aqua dest.
 - SSC, 20-fach:
 - 3 M NaCl
 - 0.3M Natriumzitat
 - in Aqua dest (pH 8.0)
 - STE-Puffer:
 - TE-Puffer (pH 8.0)
 - 150 mM NaCl
 - TBE, 5-fach:
 - 26.7g Borsäure
 - 1.9g EDTA
 - 60.6g Tris
 - ad 1000ml Aqua dest.
 - TE-Puffer:
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM Tris-Hcl
 - in Aqua dest (pH 8.0)
 - TNAE-Puffer, 100-fach:
 - 30 mM EDTA
 - 0.6 M Natriumazetat
 - 1.2 M Tris
 - in Aqua dest.
 - Waschpuffer (nach Hybridisierung)
 - 40 mM Natriumphosphat
 - in SDS 1%

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Behandlung der Tiere

Die weiblichen NOD-Mäuse wurden im Alter von 9 Wochen bezogen (2.1) und unter konventionellen Bedingungen in Käfigen in einer Reinraumanlage unter sterilen Behandlungsbedingungen mit einer Sniff-Standard-Diät und Wasser ad libitum in der Tierversuchsanlage der Katholischen Universität in Leuven/Belgien gehalten. Die konventionellen Bedingungen entsprechen der Referenz von Pozzilli über NOD-Mäuse (*Pozzilli et al. 1993*). Die Behandlung begann am Tag 70: Einem Teil der Tiere (n=44) wurden täglich 0.3ng IL-18 mit 2mg Ovalbumin als Trägerprotein i.p.gegeben, dem anderen Teil der NOD-Mäuse (n=45) wurde ausschließlich 2mg Ovalbumin i.p. verabreicht. Die Behandlung erfolgte über 4 Wochen. Im gleichen Zeitraum wurden zur Kontrolle Balb/cHan Mäuse mit täglich mit 0.3ng IL-18 und 2mg Ovalbumin behandelt. In allen Tiergruppen wurde täglich eine Untersuchung des Urins auf Glucose mit Teststreifen vorgenommen. Kam es zu einem positiven Ergebnis, wurde den Tieren Blut entnommen und dessen Glucosegehalt mittels Hexokinase-Methode bestimmt (*Kunst 1984*). Tiere wurden als manifest diabetisch eingestuft, wenn die Bestimmung der Blutglucose Werte über 300mg/dl ergab. Zudem wurden aus den jeweiligen Versuchsgruppen 6 normoglykämische Tiere vor, sowie 14 und 21 Tage nach Beginn der Behandlung getötet und weiteren Untersuchungen zugeführt.

Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte gemäß den Richtlinien der NIH publication No. 85-23, in der revidierten Fassung von 1985.

3.1.2 Tötung und Organentnahme

Die Mäuse wurden in Allgemeinanästhesie mit einer Überdosis Äther getötet. Nach Eröffnung des Situs wurde das Pankreas aus den umgebenden Strukturen freipräpariert und entnommen. Es folgte eine Halbierung in Längsrichtung vom Caput zur Cauda für die weitere histologische und molekularbiologische Analyse.

3.2 Histologische Methoden

3.2.1 Gefrierschnitttechnik

Eine Hälfte des Pankreas wurde unmittelbar nach seiner Entnahme in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan tiefgefroren und anschließend mit Einbettmedium auf Korkplatten für den Gefrierschnitt fixiert. Die Proben wurden bis zur Weiterbearbeitung bei -80°C aufbewahrt. Die histologische Aufarbeitung (Faust et al. 1994) des pankreatischen Gewebes erfolgte durch die Anfertigung von jeweils 3 etwa 5-10µm dicken Schnitten in Abständen von ca. 150µm. Ziel war es mindestens 20 verschiedene Inseln eines Tieres zu untersuchen. Die Abstände von 150µm sollten das zweimalige Anschneiden derselben Insel verhindern. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und anschließend für 10min in Aceton fixiert.

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die fixierten Gewebeschnitte wurden zunächst in Küvetten für Objektträger für 5min in Hämatoxylin gefärbt. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff, der nicht an der Blaufärbung basophiler Zellbestandteile, wie etwa der Nukleinsäuren des Kerns, beteiligt war, unter fließendem Leitungswasser über 10min entfernt. Es folgte die rote Gegenfärbung des azidophilen Zytoplasmas mit Eosin für 10 sec und eine anschließende 5 minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser. Die Schnitte wurden in der aufsteigenden Alkoholreihe, für 1min zweimal in 70%igem und dann jeweils einmal in 80, 90 und 96%igem Ethanol entwässert. Danach erfolgte die zweimalige Immersion in Xylol für 2min und die Aufbringung des Deckglases mittels Eukitt.

3.2.3 Mikroskopieren und Bestimmung der Insulitisgrade

Die Gefrierschnitte wurden lichtmikroskopisch von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt. Zielsetzung war es, den Grad der Insulitis anhand des Ausmaßes der Infiltration der Inseln durch nicht näher spezifizierte Immunzellen zu bestimmen. Es wurden fünf mögliche Infiltrationsgrade definiert: Grad 0: Keine periduktulären Infiltratzellen und weniger als 5 periinsuläre Zellen; Grad 1: Ausschließlich periduktuläre Infiltrate von 2 bis 5 mononukleären Zellen; Grad 2: periduktuläre und periinsuläre Infiltrate von mehr als 5 mononukleären Zellen ohne intrainsuläre Infiltration; Grad 3: Intrainsuläre Infiltration von

weniger als 20% der Inselfläche; Grad 4: intrainsuläre Infiltration von mehr als 20% der Inselfläche.

Aus den bestimmten Insulitisgraden von mindestens 20 Inseln wurde der Mittelwert für das jeweilige Tier, und entsprechend für die 6 Tiere umfassenden Behandlungsgruppen, gebildet. Die Insulitisgrade 0 bis 2 wurden unter dem Oberbegriff *Periinsulitis* zusammengefaßt, die Grade 3 und 4 unter *Intrainsulitis*.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation, Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle

Die Gesamt-RNA wurde aus dem frisch entnommenen Gewebe mittels saurer Guanidinium-Thiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert, die besonders für RNase-reiche Organe wie das Pankreas geeignet ist (*Chomczynski et al. 1987, Rothe et al. 1999, Rothe et al. 1997*). Hierbei wurde eine Hälfte des entnommenen Pankreas in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zerstoßen, dann in einem 15ml Reaktionsgefäß (Falcon-Tube) mit 3ml GTC- β -Mercaptoethanol unter Einsatz von Ultraschall (Ultra-Thurrax-Stab) lysiert.

Im Anschluss wurden 0.6ml Chloroform, 0.3ml 2 M Natriumazetat und 3ml Phenol zugesetzt. Nach Durchmischung wurde für 15min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient der Denaturierung und Ausfällung von Zellbestandteilen. Im nächsten Schritt erfolgte durch 20 minütige Zentrifugation (Beckmann Zentrifuge) bei 10000g und 4°C die Abtrennung der RNA, die sich in der oberen wässrigen Phase des Zentrifugats befindet (über einer mittleren Phase mit DNA und einer unteren mit Zelldetritus). Die wässrige RNA-Phase wurde in ein frisches 15ml Reaktionsgefäß (Falcon-Tube) überführt. Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens Isopropanol erfolgte die Fällung der RNA durch einstündige Inkubation bei -20°C. Durch erneute Zentrifugation mit 10000g bei 4°C für 20min (Beckmann Zentrifuge) wurde die RNA sedimentiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde sie in 0.5ml GTC-Puffer resuspendiert und unter Zugabe der gleichen Menge Isopropanol nochmals zur Fällung für eine Stunde bei -20°C in einem 1.5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) inkubiert und wie im vorherbeschriebenen Sedimentationsschritt zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde die sedimentierte RNA mit 300 μ l 75%igem DEPC-Ethanol resuspendiert und für 5min bei 7500g und 4°C erneut sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Reste des

Alkohols durch einstündige Inkubation bei 40°C im Wärmeschrank verdampft. Das entstandene Pellet wurde nach Zugabe von 200µl DEPC-Wasser durch 5min Durchmischung im rüttelnden, 65°C warmen, Thermoblock wieder in Lösung gebracht. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt (s.u.). Anschließend wurde die RNA nach Zugabe von 20µl DTT (10% des Probenvolumens) und 2µl RNasin (1% des Probevolumens) bei -80°C eingelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels eines speziellen Nukleinsäure-Photometers (Gene-Quant), das die Absorption im Wellenlängenbereich 260nm und 280nm bestimmt und aus der Extinktion die Konzentration berechnet.

Die Qualitätskontrolle der RNA-Isolation erfolgte unter zwei Aspekten: Im Rahmen der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die Verunreinigung mit Proteinen durch Bildung des Verhältnisses der Absorption 260nm:280nm beurteilt. Bei reinen Proben beträgt dieses Verhältnis 2. Verunreinigende Proteine können die Absorption bei 280nm erhöhen, die Ratio wird somit <2. Als Grenzwert für die Reinheit wurde eine Ratio von ≥ 1.8 festgelegt. Die Unversehrtheit der isolierten RNA selbst wurde durch elektrophoretische Auftrennung begutachtet. Hierzu wurden 1.2%ige TNAE-Agarosegele mit dem Zusatz von 4% Formaldehyd und 1µl Ethidiumbromid gegossen. Die gewünschte Menge Agarose wird im Puffer kurz erwärmt und anschließend in eine Gelform gegossen, an deren Rand ein Kamm eingesetzt wird. Nach Erkalten und Erstarren des Gels kann dieser entfernt werden und es bleiben die Aussparungen für das Auftragen der Proben zurück. Es wurden 5µg RNA mit 15µl RNA-Aufnahmepuffer für 10min bei 65°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Dieser Schritt dient der Entfaltung der Nukleinsäurestruktur. Es wurden 2µl RNA-Auftragspuffer zugesetzt und die Probe dann in eben diese Aussparungen (Slots) des Gels eingebracht. Die Auftrennung erfolgte für 80min bei 100V in 1fachem TNAE-Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer für RNA-Analysen. Die RNA wandert je nach Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im angelegten Spannungsfeld und lässt sich so auftrennen (siehe auch 3.3.3). Die Gele wurden im UV-Licht auf die Unversehrtheit der 18S- und 28S-rRNA-Banden, sowie fehlende mRNA-Abbauprodukte hin beurteilt.

3.3.2 Reverse Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction (PCR))

Die Kombination der beiden Methoden Reverse Transkription und PCR ermöglicht den Nachweis geringster Mengen mRNA (*Kawasaki et al. 1991*). Das Prinzip ist zunächst die Umschreibung der mRNA in cDNA sowie deren anschließende Vervielfältigung.

Die Erstellung einer cDNA aus mRNA mittels Reverser Transkription ist auf unterschiedlichen Wegen möglich. Für diese Experimente wurde das oligo(dT)-Priming verwendet. Hierbei wird die gesamte vorhandene mRNA in cDNA umgeschrieben. Die zugegebenen oligo(dT)-Nukleotide lagern sich komplementär an das Poly-A-Ende der mRNA an (Annealing). An diesem Primer beginnt die Reverse Transkriptase nun mit der weiteren komplementären Anlagerung von Nukleotiden (dNTPs) (Elongation), bis der Strang vollständig in eine komplementäre cDNA umgeschrieben ist. Der Gesamtansatz von 20µl der RT ergibt sich aus folgenden Einzelsubstanzen:

- 2µg RNA (µl entsprechend Konzentration) ad 11.5µl DEPC-Wasser
- 4.0µl 5fach RT-Puffer
- 2.0µl 100mM DTT
- 0.5µl RNasin
- 1.0µl oligo(dT)
- 1.0µl dNTPs

Der Ansatz wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt, dann für 5min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt (Entfaltung der RNA-Struktur).

Es folgte die Zugabe von 1µl Reverse Transkriptase pro Ansatz und einstündige Inkubation bei 42°C im Thermocycler. Nach erfolgter RT wurden die Proben bei 4°C gekühlt.

Im folgenden Schritt, der PCR, sollte die erstellte cDNA vervielfältigt werden, um sie einem quantitativen Nachweis zuführen zu können.

Die PCR läuft in sich wiederholenden Zyklen ab, bei denen in einer Anlagerungsphase (Annealing) 3'- und 5'-Primer an die cDNA angelagert werden. Im nächsten Schritt, der DNA-Synthese, wird der Matrizenstrang komplementär transkribiert, abschließend werden die beiden Stränge in einer Denaturierungsphase wieder voneinander getrennt. Bei diesem Verfahren steigt die Menge der amplifizierten DNA exponentiell, da sowohl die Matrize, also die mittels der RT synthetisierte cDNA, als auch der neu erstellte Strang im folgenden

Zyklus als Schablone zur Verfügung stehen. Nach etwa 40 solcher Zyklen erreicht die *PCR* ein Sättigungsplateau, da die entstehenden Produkte verstärkt mit den Primern um die Bindungsstellen konkurrieren. Um auszuschließen, dass dieses Sättigungsplateau in einem früheren Zyklus erreicht wird und die gemessenen Konzentrationsunterschiede Artefakte sind, wurden die Zykluszahlen variiert: für β -Aktin ($n= 20, 23$ und 26) und für die übrigen Primer ($n= 29, 32$ und 35). Die später bei diesen Variationen gemessenen PSL-Werte unterschieden sich nicht um mehr als 25%.

Für die jeweils eingesetzten gen-spezifischen Primer wurden Zyklen unterschiedlicher Zeitdauer im Thermocycler programmiert. Dies ist erforderlich, da das optimale Annealing bei den verschiedenen Primern bei unterschiedlichen Temperaturen (über jeweils 1min) erfolgt: Für β -Aktin, IFN- γ , IL-4 und IL-10 bei 60°C, für IL-12 p35 bei 58°C, für IL-12p40 bei 55°C und für iNOS bei 50°C. Zudem ist die Dauer der Elongationsphase, in der die Synthese der DNA erfolgt, von der zu transkribierenden Fragmentlänge abhängig, da die DNA-Polymerase ca. 1kb Nukleotide pro 1min einbauen kann. Die Elongation erfolgte jeweils bei 72°C, der optimalen Arbeitstemperatur der *Taq*-Polymerase: Für β -Aktin, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p35 und IL-12p40 80s lang, für iNOS 90s lang.

Zunächst wurde pro Ansatz folgender PCR-Mix pipettiert:

- 2 μ l 10fach PCR-Puffer minus Magnesiumchlorid
- 0.625 μ l 50mM Magnesiumchlorid
- 0.5 μ l 3'Primer
- 0.5 μ l 5'Primer
- 16.375 μ l DEPC-Wasser

Diese 20 μ l wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß auf Eis mit 5 μ l des *RT*-Produktes gemischt und mit 80 μ l Mineralöl, das die Verdunstung im Gefäß verhindert, überschichtet. Die Proben wurden dann in den 78°C warmen Thermocycler eingebracht. Dort wurde jedem Reaktionsgemisch durch Pipettieren durch die Ölschicht 1.5 μ l *Taq*-Polymerase zugesetzt. Dieser Vorgang wird als Pseudo-Hot-Start bezeichnet. Der nächste Schritt war, wie auch zum Beginn der folgenden Zyklen das Aufheizen des Thermoblocks auf 95°C für 1min zur Denaturierung, danach folgten Annealing und Elongation wie oben beschrieben. Nach Durchlaufen der Programme der jeweiligen Primer wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Für jeden der Primer wurde die *RT-PCR* dreimal durchgeführt, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Zudem wurde für jeden Versuchsansatz ein interner Standard mitbestimmt. In diesen Versuchen war es das Gen des Proteins β -Aktin, das als sogenanntes „Haushaltsgen“ (Housekeeping Gen) dient: Zum einen ermöglicht der Nachweis die Kontrolle, ob die gewünschte Reaktion abgelaufen ist, zum anderen werden durch Bildung der Ratio spezifischer Primer: β -Aktin, ermittelt aus den PSL-Werten in demselben Versuchsansatz, Ergebnisse unterschiedlicher Versuchsansätze miteinander vergleichbar.

3.3.3 DNA-Elektrophorese

Im folgenden wurde das Produkt der *RT-PCR* elektrophoretisch aufgetrennt. Dies hat zwei Gründe: Das amplifizierte DNA-Fragment hat eine bestimmte Größe und wandert, abhängig von angelegter Spannung, Puffer und Agarose-Gel-Konzentration, mit einer bestimmten Geschwindigkeit im Gel. Durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und den Vergleich mit einem Längenstandard, der 1kb-Leiter, kann unter UV-Licht beurteilt werden, ob das amplifizierte Fragment der gesuchten Genregion entspricht.

Zudem kann nach elektrophoretischer Auftrennung eine Übertragung auf Nylonmembran durchgeführt und eine semiquantitative Analyse durch radioaktive Markierung angeschlossen werden.

Es wurden 2%ige Agarosegele mit einer Konzentration von 0.5fach TBE angefertigt. Hierzu wurden:

- 1g Agarose
- 45ml Aqua dest.
- 5ml TBE 5fach

kurz in der Mikrowelle bis zum Auflösen der Agarose erhitzt und dann unter ständigem Rühren bis auf ca. 60°C abgekühlt. Vor dem Gießen des Gels wurde 1 μ l Etidiumbromid zugefügt. Die Gele wurden mit einem Kamm zur Bildung von Auftrags Taschen mit einem Fassungsvermögen von ca. 12 μ l versehen.

Das gehärtete Gel wurde in eine horizontale Elektrophorese-Kammer mit 0.5 fachen TBE eingebracht. In einem frischen Reaktionsgefäß (Eppendorf) wurden 2 μ l DNA-Auftragspuffer mit 10 μ l des *RT-PCR*-Produktes gemischt und dann vollständig in die Taschen des Gels pipettiert. In jedes Gel wurde zusätzlich in eine Tasche 6 μ l des

Längenstandards (1kb-Leiter) eingebracht. Die Auftrennung erfolgte unter gleichbleibender Spannung von 110 V über 1-1.5h.

Die Gele wurden anschließend im UV-Licht analysiert und photographiert.

3.3.4 Southern Blot

Zeigten sich bei Betrachtung des Gels im UV-Licht intakte DNA-Banden im Bereich der gesuchten Fragmentlängen, so folgte der Transfer der DNA mittels Diffusionsblot auf Nylonmembranen (Southern Blot).

Die Gele wurden zunächst für 30-45min in Denaturierungspuffer (Kapitel 2.8) leicht geschüttelt. Dieser Schritt dient der Spaltung der doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge. Anschließend erfolgte die Neutralisierung für 30-45min in Neutralisierungspuffer (Kapitel 2.8).

Die Gele wurden dann, ebenso wie das Whatman-Papier und die Hybond-N Nylonmembran für 10min, vor dem Aufbau des Blots, in 10fach SSC eingebracht.

Der Blot-Aufbau erfolgte von unten nach oben wie folgt:

Als Unterlage diente eine Glasplatte auf die 2 in 10fach SSC getränkte Whatman-Filterpapiere aufgelegt wurden. Filterpapiere und Nylonmembran wurden exakt auf die Größe des Gels zugeschnitten, um ein seitliches Überlappen, das einen Diffusionsstrom am Gel vorbei zur Folge gehabt hätte, zu vermeiden. Auf das Whatman-Papier folgte das Gel mit nach unten zeigenden Öffnungen der Slots. Luftblasenfrei wurde auf dieses die Hybond-N Nylonmembran aufgebracht. Es folgten wiederum 2 mit 10fach SSC befeuchtete Filterpapierstücke. Darauf wurde ein ca. 15cm hoher Stapel mit Zellstofftüchern gelegt. Den Abschluss nach oben bildete eine mit etwa 3kg beschwerte Glasplatte. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Am folgenden Tag, nach mindestens 12h, erfolgte der Blotabbau. Die Taschen des Gels wurden auf den Membranen eingezeichnet und entsprechend der aufgetragenen Produkte beschriftet. Bis auf diese wurden dann die Reste des Blotaufbaus, einschließlich der Gele verworfen. Die Membranen wurden anschließend zur Entfernung von Agarose-Rückständen für wenige Minuten in 4fach SSC gewaschen, dann auf Whatman-Papier liegend an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der DNA auf der Nylonmembran erfolgte abschließend eine Quervernetzung mittels Crosslink-Bestrahlung im UV-Licht mit dem UV-Stratalinker. Die Blots wurden unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.5 Southern Hybridisierung

Ziel der Hybridisierung ist die semiquantitative Bestimmung der membrangebundenen DNA-Mengen. Um diese Messung durchzuführen, wurden DNA-Fragmente im Rahmen der Insertisolierung (3.3.5.1) hergestellt, die jeweils spezifisch für die einzelnen RT-PCR-Produkte sind. In einem zweiten Schritt wurde ein komplementärer DNA-Strang mittels *Random Primed Labeling* synthetisiert, in den radioaktives [α - 32 P]dATP eingebaut wurde. Die an die Nylonmembran gebundene DNA wurde mit diesem radioaktiven Label inkubiert, um eine spezifische Bindung an den RT-PCR Produkten herbeizuführen. Die Menge der Bindungen und damit auch die Menge der membrangebundenen DNA wurden durch Analyse im Phospho-Imager quantifiziert.

3.3.5.1 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragments mit zufällig gewählten Startern (*Random Primed Labeling*)

Das zufällige Starten (*Random Priming*) zur Herstellung von hochspezifischen radioaktiv markierten DNA-Labeln ist ein etabliertes Verfahren (*Feinberg et al. 1983 und 1984*). Grundlage ist die zufällige (random) Anlagerung von Hexanukleotiden an sequenzspezifische DNA-Stücke, sogenannte Templates. Dieser so entstandene Primer-Template-Komplex stellt das Substrat für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I dar. Das Enzym baut Nukleotid-Monophosphate an der freien 3'-OH-Gruppe der Primer an und synthetisiert so einen neuen DNA-Strang. Radioaktiv wird dieser Strang durch den Einbau eines radioaktiven Nukleotids; [α - 32 P] dATP statt dATP. Das so entstandene DNA-Stück, die radioaktive Sonde, kann als Marker für die Southern Blot-Hybridisierung eingesetzt werden. Die Messung der Radioaktivität ermöglicht Aussagen über die Häufigkeit des Einbaus der Sonde (*Southern et al. 1975, Smith et al. 1980*).

Die hierbei verwendeten DNA-Templates entsprechen Fragmenten der DNA-Abschnitte, die durch die jeweiligen spezifischen Primer flankiert, in der PCR vervielfältigt wurden. Mittels Restriktions-Endonukleasen werden solche Fragmente zwischen den Primer-Bindungsstellen herausgeschnitten. Ihre Länge sollte 100 Basen nicht unterschreiten, um ihre Isolierung nicht zu erschweren. Die für diese Versuche verwendeten DNA-Templates waren bereits synthetisiert und im Labor des DFI verfügbar. Daher wird die Methode ihrer Herstellung hier nur skizziert: Mit den spezifischen Primern wird die in Plasmiden enthaltene DNA der Zellprodukte von Interesse in Mehrfach-PCRs vervielfältigt. Die so hergestellten größeren Mengen an DNA werden dann jeweils sequenzspezifisch mit einer

oder mehreren Restriktionsendonukleasen gespalten. Die DNA wird gefällt und mittels Agarose Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.3) aufgetrennt. Unter UV-Licht wird geprüft, ob die Fragmente die erwartete Größe besitzen. Die DNA-Banden werden dann aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wird mit speziellen Kits aus der Agarose isoliert. Nach Fällung und Konzentrationsbestimmung steht sie als Template zur Verfügung.

Die Herstellung der Labels erfolgte unter Verwendung von [$\alpha^{32}\text{P}$] dATP, mit einer spezifischen Aktivität von 3000Ci/mmol, im wesentlichen gemäss Protokoll des *Stratagene Prime-It II* Kits. Aufgrund der Erfahrungen unseres Labors wurde die Hälfte der im Protokoll angegebene Mengen verwendet, da auch mit diesen hohe spezifische Aktivität und gute Ergebnisse bei Reduktion der Menge an radioaktivem [$\alpha^{32}\text{P}$] dATP, erzielt wurden. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 12.5ng DNA (μl -Menge gemäss Konzentration)
- ad 12 μl Aqua dest.
- 5 μl Random Primer

wurden in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf) vermischt und dann im Thermoblock für 5min bei 95°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde kurz zentrifugiert um Kondensniederschlag zu sammeln und auf Eis gestellt.

Anschließend wurden:

- 5 μl 5-fach Puffer für dATP
- 2.5 μl [$\alpha^{32}\text{P}$] dATP und
- 0.5 μl Klenow

hinzugegeben und der Ansatz mit der Pipette durchmischt. Es folgt die Inkubation im Thermoblock bei 37°C für 2-10min. Abschließend wurde 1 μl Stop-Mix zugefügt.

Die Generierung des radioaktiven Labels in wenigen Minuten wird durch zwei Besonderheiten des Kits ermöglicht: Zum einen durch die Verwendung von Nonamer-Random-Primern, zum anderen durch ein mutiertes Fragment der DNA-Polymerase I, das 3'Exonuklease-defiziente [Exo(-)Klenow].

Die Proben wurden in den *Nuc Trap probe purification columns* von Stratagene (Heidelberg) von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt.

Diese Säulen wurden zunächst mit 70 μl STE äquilibriert und dann über ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) eingehängt. Anschließend wurde der Label mit 45 μl STE auf ein Volumen von 70 μl aufgefüllt, in die Säule eingebracht und nach Durchlaufen im Eppendorf-

Reaktionsgefäß aufgefangen. Abschließend wurden nochmals 70µl STE durch die Säule gegeben. Die Aktivität der Probe wurde durch Aufnahme von 3µl in eine Pipetten-Spitze mittels des Handmessgeräts *Contamat* bestimmt. Die erzeugten Proben radioaktiv markierter DNA-Fragmente standen dann für die Hybridisierung der Southern Blots zur Verfügung.

3.3.5.2 Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde mit der membrangebundenen DNA

Das Vorgehen bei der Hybridisierung erfolgte im wesentlichen nach der von Maniatis beschriebenen Methode (*Sambrook, Maniatis 1989*). Die komplementären Stränge der membrangebundenen DNA und der radioaktiv markierten Fragmente lagern sich spezifisch aneinander und können detektiert werden.

Hierzu werden die Nylonmembranen der Blots überlappungsfrei so in 50ml Reaktionsgefäße (Falcon-Tubes) eingebracht, dass sie an der Innenwand anliegen. Die Membranen werden dann zunächst vorhybridisiert: Sie werden in den Reaktionsgefäßen mit 3ml 65°C warmem Church's-Puffer (Kapitel 2.8) befeuchtet und für 10min im 65°C warmen Wärme-Umwälz-Schrank, unter langsamer Rotation um die Längsachse, inkubiert. Dieser Schritt dient der Abbindung unspezifischer Bindungsstellen der Nylonmembran.

In der Zeit während der Vorhybridisierung, wird der radioaktive Label für 10min bei 95°C im Wärmeblock inkubiert, um die Doppelstränge der DNA zu trennen, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Dann wird der Gesamtansatz für die Hybridisierungslösung hergestellt: Pro Reaktionsgefäß werden 2.5ml 65°C warmen Church's Puffer in ein gemeinsames frisches 50ml Reaktionsgefäß gegeben. Der Gesamtansatzmenge (entspricht dem Produkt aus Anzahl der Falcon-Tubes und 2.5ml) wird dann der radioaktive Label aus dem Eppendorf- Reaktionsgefäß (Menge ca. 140µl) hinzugemischt. Aus jedem Falcon-Tube mit Nylonmembran wird die Vorhybridisierungslösung dekantiert und durch 2.5ml Hybridisierungslösung ersetzt. Die Tubes werden dann wieder in den Wärme-Umwälz-Schrank eingebracht und über Nacht (mind. 12h) bei 65°C, unter langsamer Rotation um die Längsachse zur gleichmäßigen Benetzung der Membranen, inkubiert.

An die Hybridisierung schließen sich mehrere Waschvorgänge an, um unspezifisch-gebundenen Label sowie überschüssige Hybridisierungslösung zu entfernen: Zunächst wird

die Hybridisierungslösung dekantiert, in die Falcon-Tubes 10ml Waschpuffer gegeben, geschwenkt und ebenfalls dekantiert. Die Membranen werden dann in eine Schale eingebracht und im Waschpuffer für 30-45min bei 65°C leicht geschüttelt. Dieser Schritt wiederholt sich, bis keine Radioaktivität mehr im Puffer nachweisbar ist, in der Regel etwa zweimal. Die noch feuchten Blots werden in Gefrierbeutel eingeschweißt und anschließend quantifiziert.

3.3.5.3 Quantifizierung der Radioaktivität mittels Phospho-Imager

Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgt mit Hilfe des *Fujix-BAS-Bio-Imagers*. Das System verfügt über eine Bildplatte, die ähnlich einem Film zur Aufnahme der radioaktiven Signale dient. Die Platte wird zunächst in der Scanner-/Extinguisher-Einheit des Phospho-Imagers gelöscht und dann mit den hybridisierten Nylonmembranen in einer speziellen Kassette, je nach Aktivität des Labels zwischen 10min und 1h, belichtet. Die Platte wird dabei, unter Erreichen einer sehr feinen Auflösung, durch die radioaktive Sonde zur Eigenemission von Strahlung angeregt. Dieser Vorgang trägt die Bezeichnung *Phospho Stimulated Luminescence, PSL*. Der Scanner des Phospho-Imagers, in den die Platte nach Belichtung eingelegt wird, liest die Strahlung dann pro Minute als *counts per minute, cpm*, ab. Die Software des Gerätes ermöglicht mit der automatischen Konturierung um die Strahlung der Bande, das Beziehen der cpm auf die Fläche und Bandengröße. Es kann somit ein absoluter Wert für die jeweilige Bande bestimmt werden, der mit der anfangs eingesetzten Menge an mRNA korreliert.

Um die Werte unter einander vergleichbar zu machen und Schwankungen in den einzelnen Arbeitsschritten und -tagen auszugleichen, wird das Verhältnis mit einem internen Standard gebildet. Die zu den jeweiligen mRNA-Proben gehörenden Messwerte werden durch die im gleichen Versuch gemessenen Menge an β -Aktin mRNA geteilt. Da dieses Produkt gleichmäßig im Pankreas exprimiert wird, ermöglicht es methodische Schwankungen zu eliminieren und die unterschiedlichen Werte in Beziehung zu einander zu setzen.

Für jeden eingesetzten Primer wurden pro Versuchstier so 3 absolute Messwerte bestimmt, aus diesen das Verhältnis mit den zugehörigen β -Aktin-Werten gebildet und danach der Mittelwert gebildet.

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Diabetes-Inzidenz im Tierversuch, sowie des Grads der Insulitis erfolgte mittels des Chi²-Tests.

Die Mittelwerte der radioaktiven Signale der RT-PCR-Produkte wurden mit Student's t-Test bei Normalverteilung und Wilcoxon-Test bei Nicht-Normalverteilung berechnet, sowie der Rang-Korrelation nach Spearman oder der linearen Regression.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0.05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Ergebnisse

Das klinische Resultat einer destruktiven Insulitis mit der Zerstörung pankreatischer β -Zellen ist die Manifestation eines Diabetes mellitus. Das Ziel dieser Arbeit war den Einfluss von IL-18 auf diesen pathogenen Mechanismus zu untersuchen. Wie im Absatz 1.3 erläutert, war die Bestimmung des Einflusses von IL-18 auf die Diabetes-Inzidenz in den einzelnen Tiergruppen als Ausdruck der klinischen Manifestation der Insulitis der erste Untersuchungsaspekt. Eine Gruppe von 45 NOD Mäusen wurde für 4 Wochen, beginnend am 70. Lebensstag, mit 0.3ng IL 18 + 2mg OVA behandelt. Die andere Gruppe von 44 NOD Mäusen wurde unter gleichen Bedingungen nur mit 2mg OVA behandelt. Als zweite Kontrollgruppe wurden dreißig nicht diabetes-suszeptible Balb/c Mäuse mit 0.3ng IL 18 + 2mg OVA behandelt. Bei allen Tieren wurden nach Behandlungsbeginn täglich Tests auf Uringlukose durchgeführt, positive Befunde wurden mit der Blutglukosebestimmung verifiziert, wobei Spiegel über 300mg/dl als diabetisch gewertet wurden (*s. Kapitel 3.1.1*).

4.1.1 Vergleich der Diabetes-Inzidenz von IL 18 behandelten und unbehandelten NOD Mäusen.

Die Behandlung der NOD Mäuse mit IL-18 führte zu einer verminderten Diabetes Manifestation (9 von 27) im Vergleich zu den kontroll-behandelten NOD-Mäusen (17 von 27). Zudem war unter IL-18 Einfluss ein verzögerter Beginn des Diabetes festzustellen.

Im Beobachtungszeitraum bis zum Tag 200 sind von den 27 mit IL 18 behandelten NOD Mäusen 9 diabetisch geworden. Von den kontroll-behandelten NOD Mäusen sind im gleichen Zeitraum 17 von 26 Tieren diabetisch geworden. (Die Differenz zur Gesamtanzahl von 45 IL 18 behandelten und 44 unbehandelten NOD-Mäuse ergibt sich durch in 3.1 geschilderte Entnahme von jeweils 6 normoglykämischen Tieren an den drei Zeitpunkten 0, 14 und 21 Tage nach Behandlungsstart). Hieraus resultiert eine Diabetes-Inzidenz von 33.33% für die IL-18 behandelten und von 65.38% für die kontroll-behandelten NOD Mäuse am Ende des Beobachtungszeitraums. Die Kontrollgruppe der IL-18 behandelten nicht diabetes-suszeptiblen Balb/c Mäuse hat keine Diabetesmanifestation oder erhöhte Blutglucose-Spiegel gezeigt (0 von 30). (*Abb. 1*)

Die Behandlung der NOD Mäuse mit IL-18 unterdrückte die Diabetes-Manifestation. Zusätzlich war ein verzögertes Auftreten der ersten diabetischen Tiere zu beobachten. Während in der kontroll-behandelten Gruppe innerhalb von Tagen die erste Manifestation auftrat, trat sie bei der IL 18 behandelten Gruppe mit einer Verzögerung von 3 Wochen ein. (Abb.1)

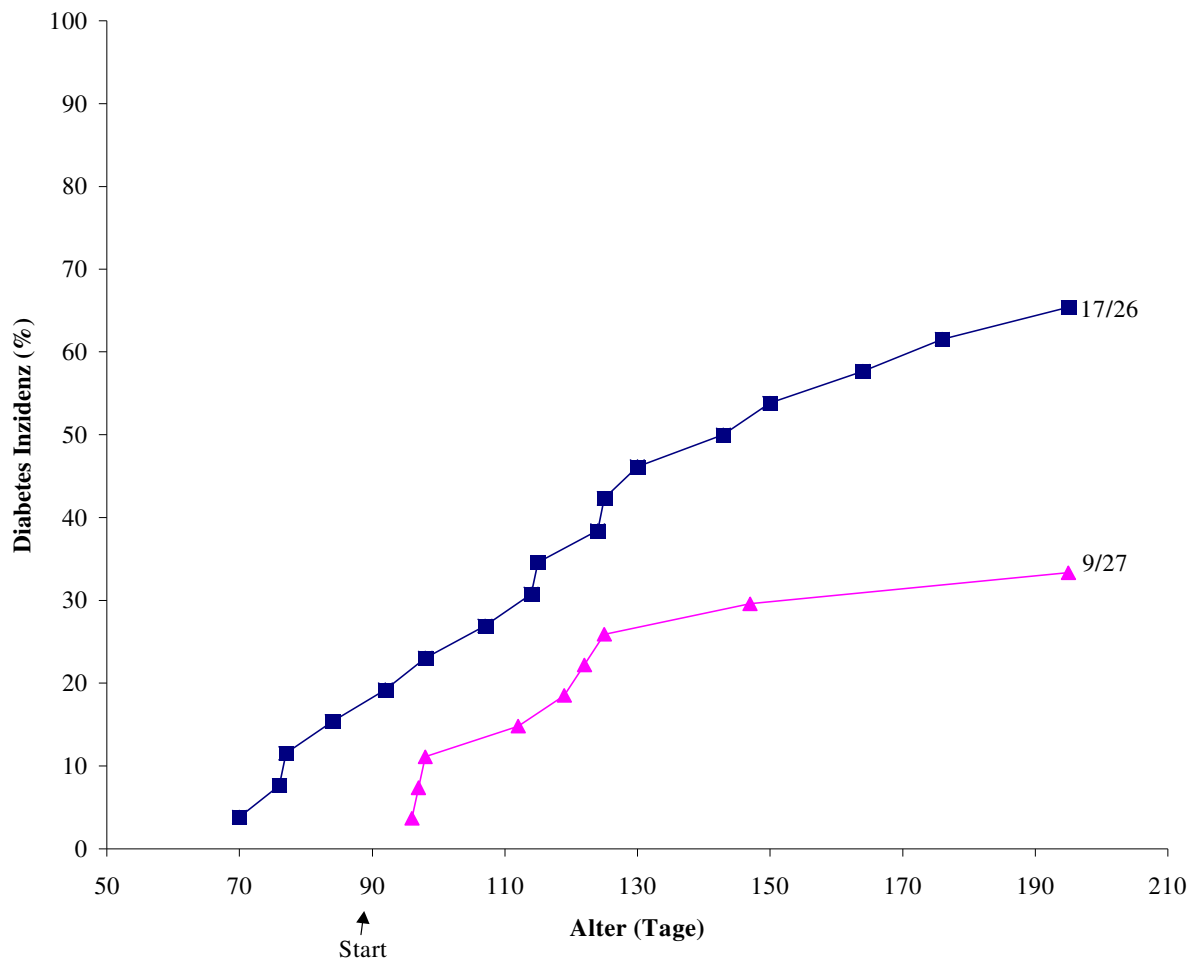


Abb. 1: Diabetes-Inzidenz IL-18 behandelter und kontroll-behandelter NOD-Mäuse. ■ Prozentualer Anteil diabetischer Tiere in der NOD-Kontroll Gruppe; ▲ IL-18 behandelte NOD-Mäuse ($p < 0,001$). Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.2 Histologische Ergebnisse

Die Beurteilung der Histologie und Insulitisgrade sollte Aufschluss über den Einfluss von IL-18 auf das Verhältnis Peri- versus Intra-insulitis und damit auf die Aggressivität der Infiltration der Langerhans'schen Inseln geben. (s. Kapitel 3.2)

An den Behandlungstagen 0, 14 und 21 wurden jeweils 6 normoglykämischen Tieren aus den drei Gruppen (NOD Mäuse +/- IL-18 Behandlung; Balb/c Mäuse + IL-18-Behandlung) die Bauchspeicheldrüsen entnommen. Eine Hälfte der der Länge nach halbierten Organe wurde histologischen Untersuchungen zugeführt (s. Kapitel 3.2.1-2). Das Ausmaß der Infiltration der Inseln mit mononukleären Entzündungszellen wurde quantifiziert und als Insulitisgrade beschrieben. Fünf Insulitisgrade wurden unterschieden: Grad 0 zeigt keine Insulitis, Grad 1 bis 2 werden als *Periinsulitis* und die Grade 3 und 4 als *Intrainsulitis* zusammengefasst (s. Kapitel 3.2.3). Auf die Bedeutung dieser beiden unterschiedlichen Infiltrationsmuster der Langerhans'schen Inseln wurde bereits in der *Einleitung* ausführlich eingegangen (s. Kapitel 1.2.).

4.2.1 Vergleich des Verhältnisses Peri- versus Intrainsulitis der IL-18 behandelten und unbehandelten NOD Mäuse.

Tabellarischer Vergleich des Verhältnisses Peri- versus Intrainsulitis der IL-18 behandelten und kontroll-behandelten NOD Mäuse, sowie der IL-18 behandelten Balb/c-Mäuse.(Tab. 1)

Versuchstiere	Behandlung	Tage nach Behandlung	Keine Insulitis (Grad 0)	Periinsulitis% (Grad 1 und 2)	Intrainsulitis% (Grad 3 und 4)
BALB/c	OVA	0	100	0	0
NOD	OVA	0	17	29	54
BALB/c	IL-18+OVA	14	100	0	0
NOD	OVA	14	3	19	78
NOD	IL-18+OVA	14	19	49	32
BALB/c	IL-18+OVA	21	100	0	0
NOD	OVA	21	9	23	68
NOD	IL-18+OVA	21	24	45	31

Tab 1: Einfluss der Behandlung von IL-18 auf die Entwicklung der Insulitis in NOD-Mäusen. Mittlere Infiltrationsgrade der IL-18 behandelten und kontroll-behandelten NOD-Mäuse: Grad 0: Keine Periinsulitis, Grad 1: 2-5 mononukleäre Zellen; Grad 2: Mehr als 5 Zellen ohne Intrainsulitis, Grad 3: <20% intrainsuläre Infiltration; Grad 4: >20% intrainsuläre Infiltration.

Um die Auswirkung von IL-18 auf die Insulinitis prädiabetischer Mäuse zu analysieren, führten wir zu den Zeitpunkten 0, 14 und 21 der IL-18 Behandlung histologische Untersuchungen an jeweils 6 Tieren der einzelnen Gruppen durch. Vor der IL-18 Behandlung zeigten die meisten Inseln der NOD-Mäuse das Bild einer Intrainsulinitis (54%) mit einem medianen Insulinitis-Score von 2,4. An den folgenden Untersuchungszeitpunkten 14 und 21 Tagen war eine deutliche Zunahme der Insulinitis in den kontroll-behandelten normoglykämischen NOD-Mäusen zu beobachten. Fast alle Inseln zeigten einen fortgeschrittenen Insulinitisgrad mit einer Intrainsulinitis (78% und 68%). (Abb. 2)

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den normoglykämischen IL-18 behandelten NOD-Mäusen kein Fortschreiten der Insulinitis im Untersuchungszeitraum. Der Anteil an Inseln mit Intrainsulinitis hat nicht zugenommen (31% und 32%), sondern vielmehr noch deutlich abgenommen im Vergleich zu den kontroll-behandelten 70 Tage alten NOD-Mäusen am Tag 0 des Untersuchungszeitraums ($p < 0.05$). (Abb. 2)

Der Insulinitisgrad der IL-18 behandelten NOD-Mäuse war an den Tagen 14 ($p < 0.005$) und 21 ($p < 0.05$) signifikant niedriger als in der kontroll-behandelten Gruppe. (Abb. 2)

Die mit IL 18 behandelten Balb/c Mäuse zeigten keine Infiltration der pankreatischen Inseln, die den Grad 1 erreichten. Sie sind daher nicht in der Abbildung dargestellt.

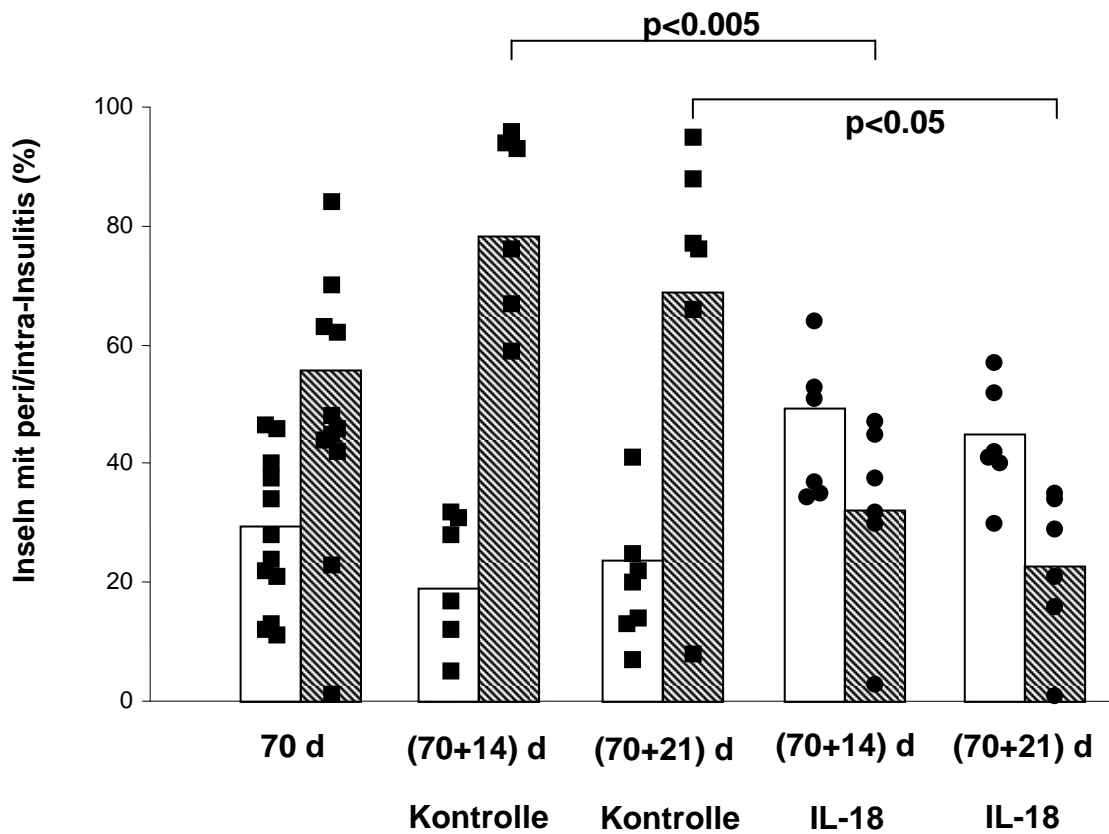


Abb. 2: Analyse der Insulinitis zu den jeweiligen Zeitpunkten der Untersuchung . Die Einzelwerte stellen den Durchschnitt-Score von 20-40 untersuchten Langerhans ´schen Inseln pro Einzeltier dar: □ steht für den Mittelwert der Inseln mit Periinsulinitis, ▨ für die mit Intra-insulinitis. Da die balb/c-Mäuse keine Insulinitis zeigten, sind sie nicht dargestellt.

4.3 mRNA Expression

Die zweite Hälfte der Pankreata, die den Tieren an den Zeitpunkten 0, 14 und 21 Tage nach Behandlungsstart entnommen wurden, wurde für die semiquantitative Bestimmung von mRNA (*s. Kapitel 3.3*) beschrieben aufgearbeitet. Im Mittelpunkt unseres Interesses standen die mRNA Expression von Zytokinen, die spezifisch für Th1- und Th2-Zellen exprimiert werden, von Zytokinen die spezifisch von Makrophagen exprimiert werden, sowie von iNOS als einem eng mit der β -Zell-Zerstörung verbundenen Parameter.

Die semiquantitative mRNA Bestimmung erfolgte wie oben beschrieben (*s. Kapitel 3.3*).

4.3.1 Vergleich der Expression der mRNA von Th1 und Th2 Zytokinen in IL-18 behandelten und kontroll-behandelten NOD Mäusen.

Im Abschnitt 1.2.6 wurde auf die Bedeutung des Konzepts der Dominanz unterschiedlicher T-Helferzell-Subpopulationen und ihrer Zytokine in der Pathogenese des Typ 1 D.m. hingewiesen.

4.3.1.1 IFN γ mRNA Expression

Kennzeichnendes Zytokin der Th1-Zellen, die die aggressive Intrainsulitis bestimmen, ist das IFN γ .

Die kontroll-behandelten NOD-Mäuse zeigten eine verstärkte Expression der mRNA des Th1-Zytokins IFN γ am Tag 21 ($p < 0.05$). Auch die IL-18 behandelten normoglykämischen NOD-Mäuse zeigten einen signifikanten Anstieg der Expression von IFN γ ($p < 0.01$). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der IL-18 behandelten und der Kontrollgruppe. IL-18 zeigte keinen wesentlichen erkennbaren Einfluss auf die IFN γ mRNA Expression der Balb/c Mäuse. (*Abb.3*)

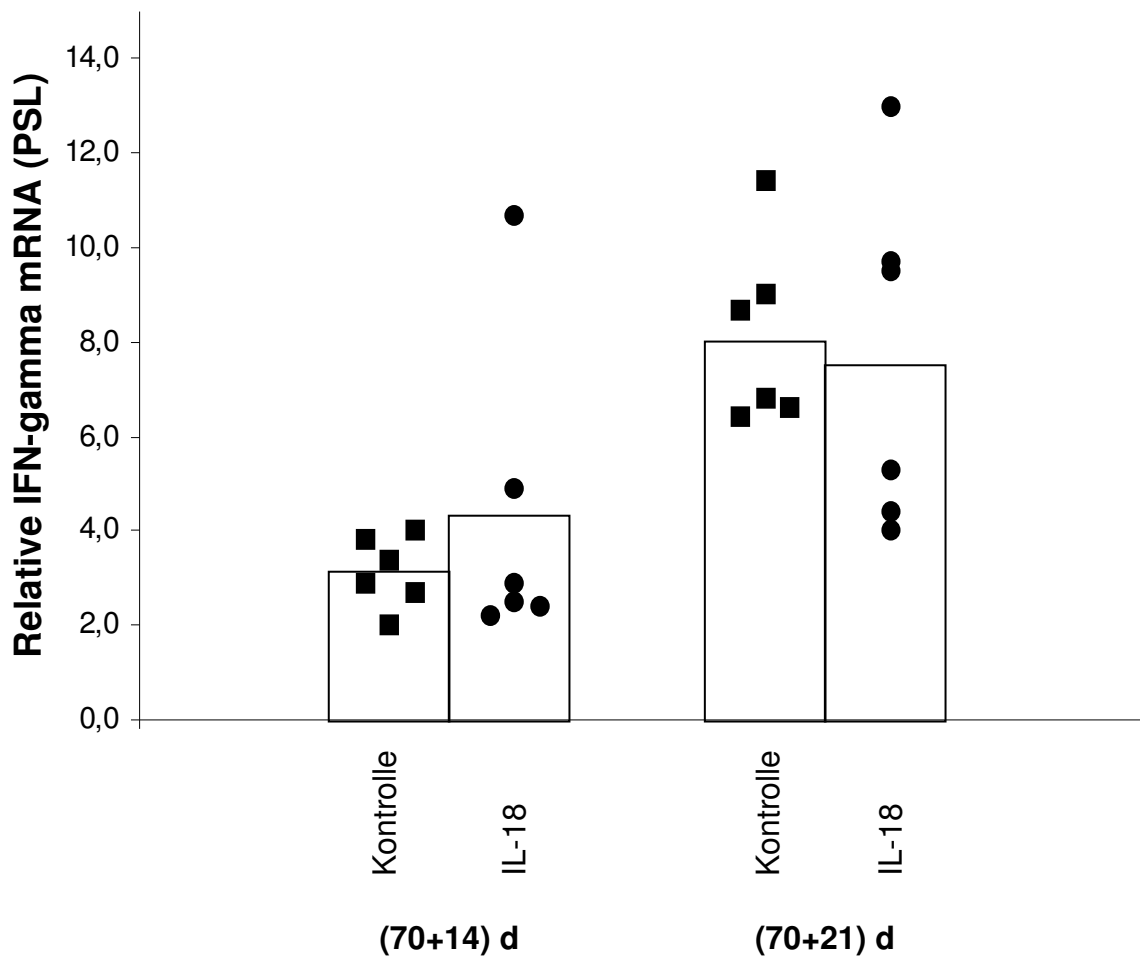


Abb. 3: RT-PCR Analyse des Th1-Zytokins $IFN\gamma$ in den Pankreata der behandelten und kontroll-behandelten NOD Mäuse an den Tagen 70+14 und 70+21. Die Einzelwerte stellen die relative Quantität des PCR-Signals von $IFN\gamma$ als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten der individuellen Mäuse dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.3.1.2 IL-10 mRNA Expression

Ein kennzeichnendes Zytokin der Th2-Zellen ist IL 10..

Weder 14 noch 21 Tage nach Behandlungsbeginn war ein signifikanter Unterschied in der Genexpression von IL-10 in der IL-18 behandelten und der kontroll-behandelten Gruppe der NOD Mäuse festzustellen. IL-18 zeigte keinen wesentlichen erkennbaren Einfluss auf die IL-10 mRNA Expression der Balb/c Mäuse. (Abb. 4).

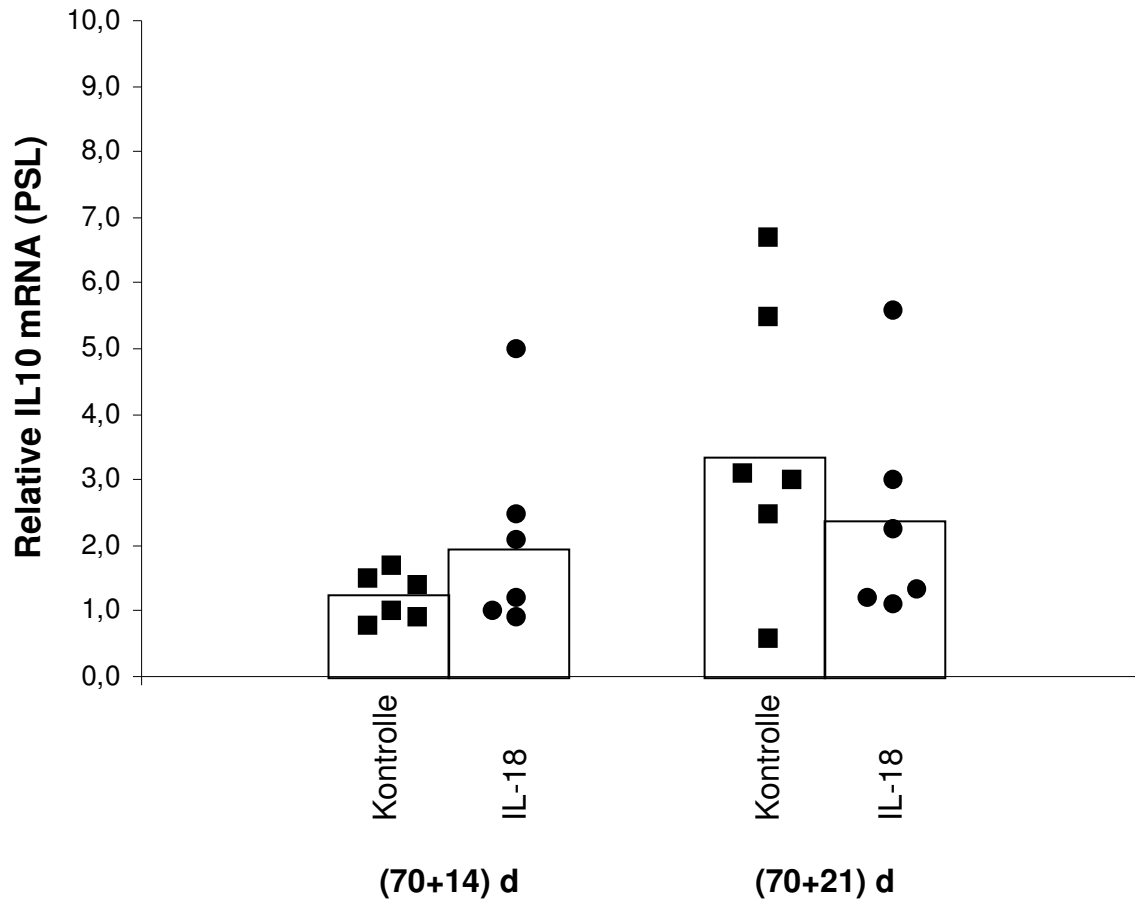


Abb. 4: RT-PCR Analyse des Th2-Zytokins IL-10 in den Pankreata der behandelten und kontroll-behandelten NOD Mäuse an den Tagen 70+14 und 70+21. Die Einzelwerte stellen die relative Quantität des PCR-Signals von IL-10 als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten der individuellen Mäuse dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.3.1.3 IL-4 mRNA Expression

Bei der mRNA Expression von IL-4, einem weiteren Th2 spezifischen Zytokin, war 14 Tage nach Behandlungsstart noch kein eindeutiger Unterschied bei den IL-18 behandelten und kontroll-behandelten NOD-Mäusen zu beobachten. Eine signifikant gesteigerte IL-4 mRNA Expression zeigte sich bei den IL-18 behandelten NOD-Mäusen am Tag 21 nach Behandlungsbeginn im Vergleich zu den kontroll-behandelten NOD-Mäusen ($p < 0.05$). IL-18 zeigte keinen wesentlichen erkennbaren Einfluss auf die IL-4 mRNA Expression der Balb/c Mäuse. (Abb. 5)

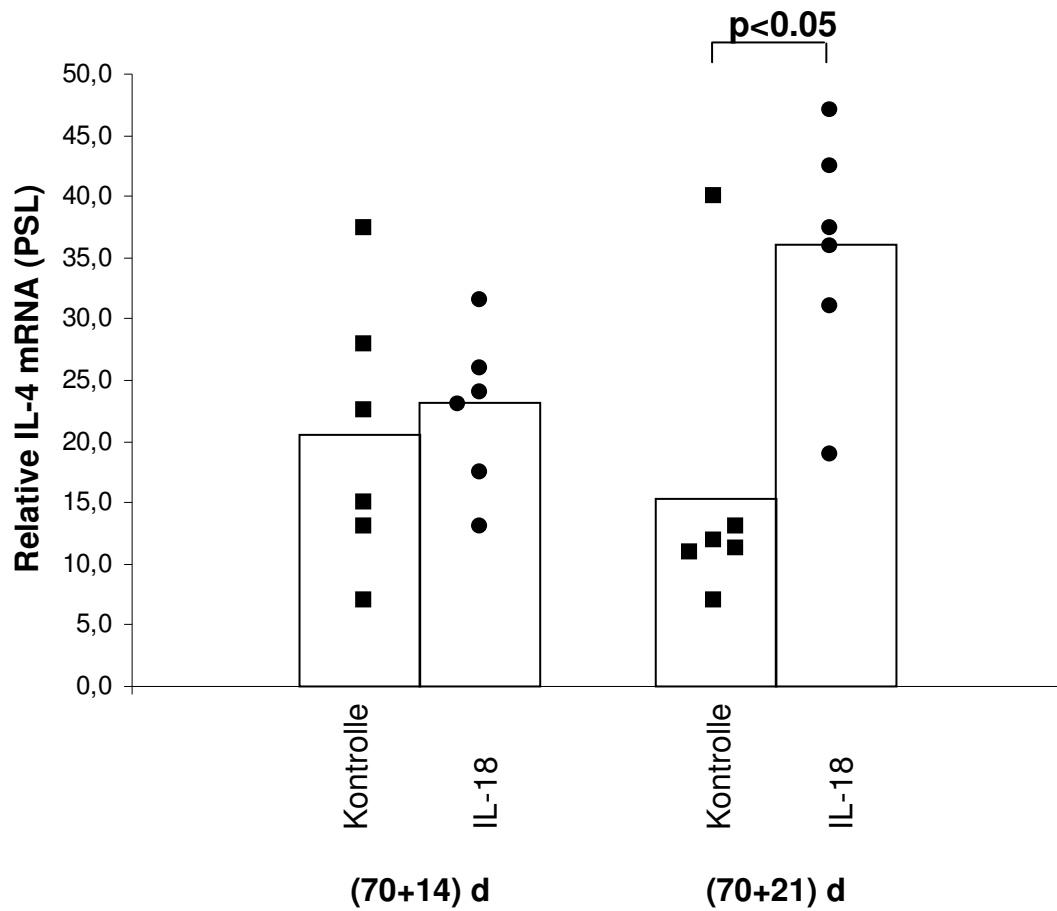


Abb. 5: RT-PCR Analyse des Th2-Zytokins IL-4 in den Pankreata der behandelten und kontrollbehandelten NOD Mäuse an den Tagen 70+14 und 70+21. Die Einzelwerte stellen die relative Quantität des PCR-Signals von IL-4 als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten der individuellen Mäuse dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.3.1.4 Verhältnis von Th1 und Th2-Zytokin-mRNA Expression

In 4.3.1.1, 4.3.1.2 und 4.3.1.3 sind die jeweiligen mRNA-Expressionen des Th1-Zytokins IFN γ und der Th2-Zytokine IL-10 und IL-4 der unterschiedlich behandelten NOD-Mäuse zu den Zeitpunkten 14 und 21 Tage beschrieben. Ausgenommen der signifikant erhöhten IL-4 Expression bei den IL-18 behandelten NOD-Mäusen am Zeitpunkt 21 Tage (4.3.1.3) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den behandelten und kontroll-behandelten Gruppen von NOD-Mäusen.

Der signifikanter Einfluss der IL-18 Behandlung wurde durch die Bildung des Verhältnisses zwischen der mRNA Expression des Th1-Zytokins IFN γ und der mRNA Expression des jeweiligen Th2-Zytokins IL-4 bzw. IL-10 in den individuellen NOD-Mäusen sichtbar.

An den Zeitpunkten 14 und 21 Tage nach Behandlungsstart zeigte sich eine signifikante Erniedrigung im Verhältnis der mRNA Expression der Zytokine IFN γ /IL-10 der individuellen IL-18 behandelten Tiere. Die kontroll-behandelten NOD-Mäuse zeigten im Gegensatz ein höheres Verhältnis der mRNA Expression der Zytokine IFN γ /IL-10, im Sinne einer Th1 gewichteten Reaktion. (14 Tage $p < 0.05$; 21 Tage $p < 0.01$; $p < 0.005$ unter Ausschluss der höchsten Messwerte(Ausreißer)). Für die Balb/c Mäuse zeigte sich kein erkennbares Muster in der Kalkulation der Ratio. (Abb. 6)

Bereits die mRNA Expression von IL-4 (Abb. 5) zeigte am Zeitpunkt 21 Tage den signifikanten Einfluss von IL-18 auf die Expression dieses Th2-Zytokins. Die Berechnung des mRNA Verhältnisses von IFN γ /IL-4 in den Einzeltieren zeigte ebenfalls, dass sich die Verschiebung zur Th1-Dominanz in den Pankreata der NOD-Mäuse durch die Behandlung mit IL-18 aufhalten lässt. (21 Tage $p < 0.002$). Für die Balb/c Mäuse zeigte sich kein erkennbares Muster in der Kalkulation der Ratio. (Abb. 7)

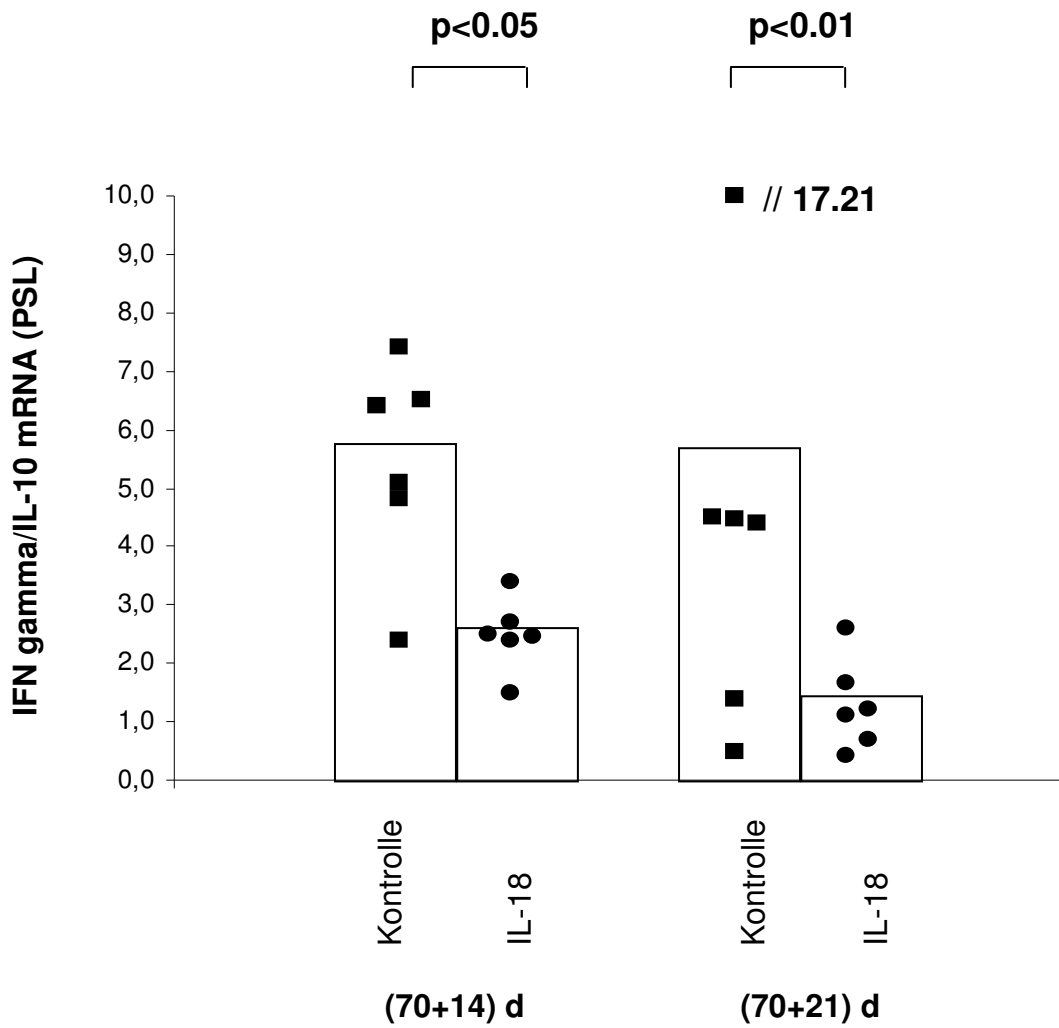


Abb. 6: $IFN\gamma/IL-10$ mRNA Expression in den Pankreata der individuellen behandelten und kontrollbehandelten NOD Mäuse an den Tagen 70+14 und 70+21. Die Einzelwerte stellen die relative Quantität der $IFN\gamma/IL-10$ -Ratio der PCR-Signale in den Einzeltieren als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

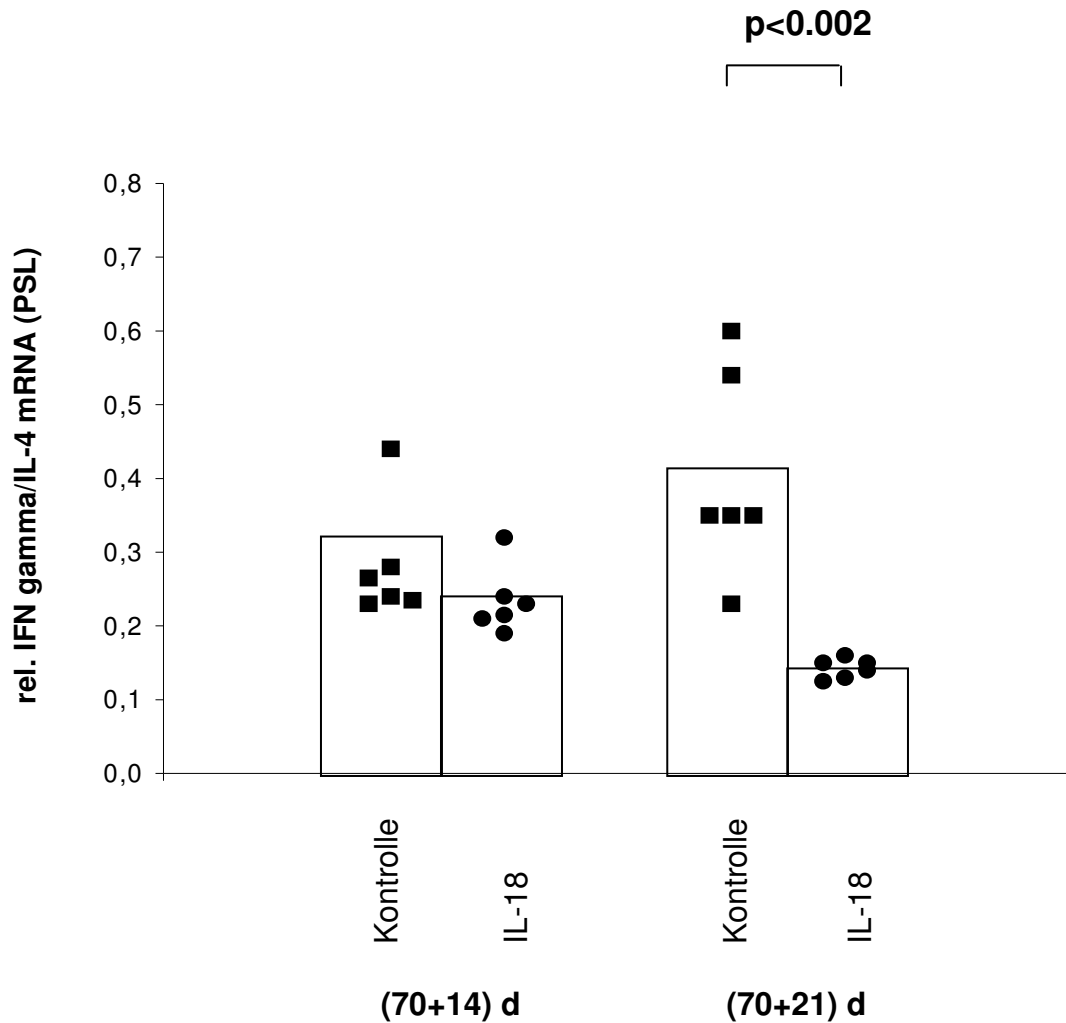


Abb. 7: $IFN\gamma$ /IL-4 mRNA Expression in den Pankreata der individuellen behandelten und kontrollbehandelten NOD Mäuse an den Tagen 70+ 14 und 70+21 .Die Einzelwerte stellen die relative Quantität der $IFN\gamma$ /IL-4-Ratio der PCR-Signale in den Einzeltieren als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.3.2 Einfluss der IL-18 Behandlung auf die mRNA Expression der Th1-induzierenden Makrophagen-Zytokine.

Neben dem direkten Kontakt zwischen T-Helferzellen und APCs ist die Sezernierung von Zytokinen durch letztere entscheidend für die Differenzierung zu einer bestimmten Subpopulation der Th Zellen. IL-12 und IL-18 sind zwei wichtige Zytokine, die zu einer verstärkten Ausdifferenzierung von Th1-Zellen führen (1.2.5.1).

4.3.2.1 Endogene IL-18 mRNA Expression

Weder an Tag 14 noch an Tag 21 nach Behandlungsbeginn zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL-18 mRNA Expression in den IL-18 behandelten NOD-Mäusen. Im Gegensatz dazu zeigten die kontrollbehandelten NOD-Mäuse eine signifikante Hochregulation dieses Zytokins am Tag 21 ($p < 0.05$). Es zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von IL-18 und dem Auftreten einer Intransulitis ($p < 0.01$) am Tag 21. IL-18 zeigte keinen wesentlichen erkennbaren Einfluss auf die IL-18 mRNA Expression der Balb/c Mäuse. (Abb. 8)

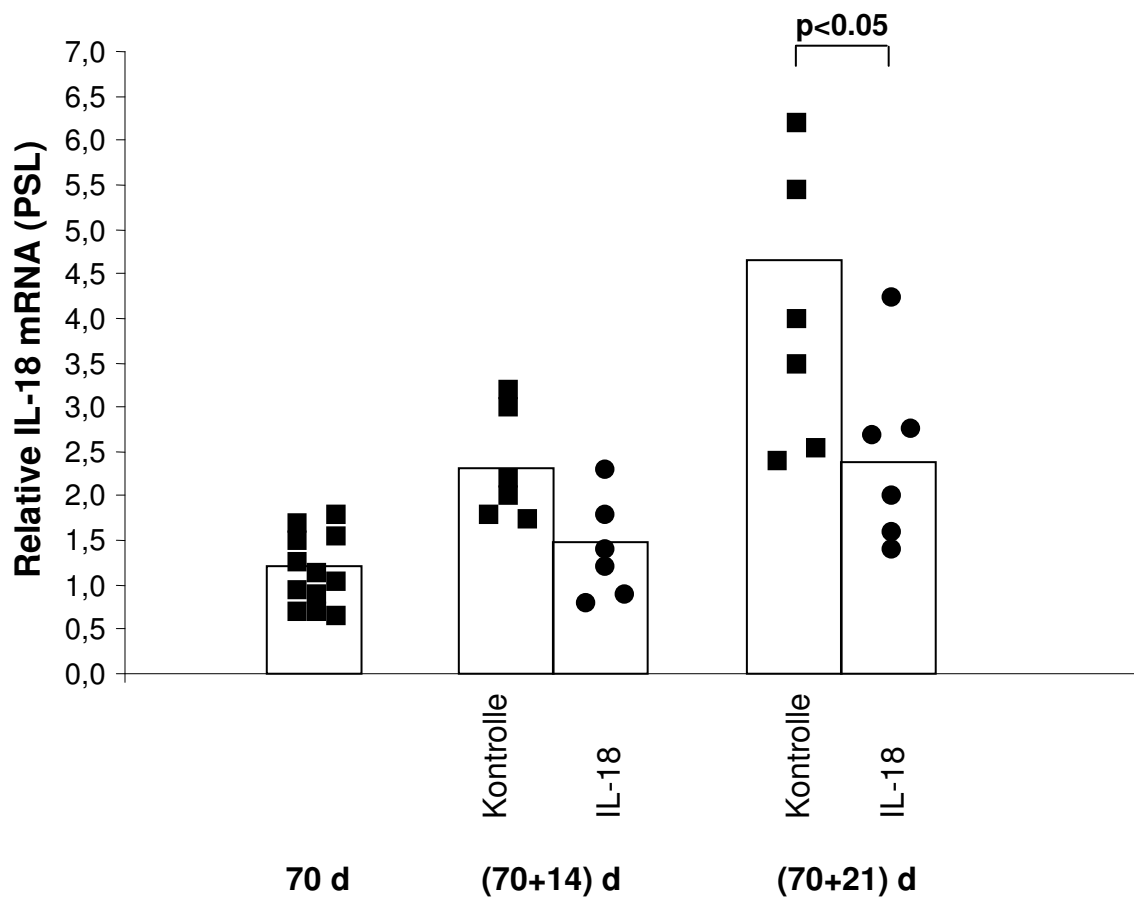


Abb. 8: IL-18 mRNA Expression in den Pankreata der IL-18 behandelten und kontrollbehandelten NOD Mäuse an den Tagen 70+ 14 und 70+21. Die Einzelwerte stellen die relative Quantität des PCR-Signals von IL-18 als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten der individuellen Mäuse dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.3.2.2 IL-12 mRNA Expression

Als weiteres Th1-induzierendes Zytokin wurde IL-12 untersucht. IL-12 besteht aus den Untereinheiten p40 und p35. An den Tagen 14 und 21 nach Behandlungsbeginn wurde das Verhältnis der IL-12 Untereinheiten IL-12p40 und IL-12p35 in den individuellen Tieren bestimmt. In den mit IL-18 behandelten Gruppen von NOD-Mäusen zeigte sich keine Hochregulation des Verhältnisses von IL-12p40/IL-12p35 mRNA Expression. Bei den kontroll-behandelten NOD-Mäusen zeigt sich eine signifikante Zunahme des Verhältnisses IL-12p40/IL-12p35 am Tag 21 ($p < 0.05$). Die Expression der Th1-induzierenden Zytokine korrelierte an Tag 21 signifikant in den individuellen Tieren und es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten von Intransulitis ($p < 0.05$). (Abb. 9)

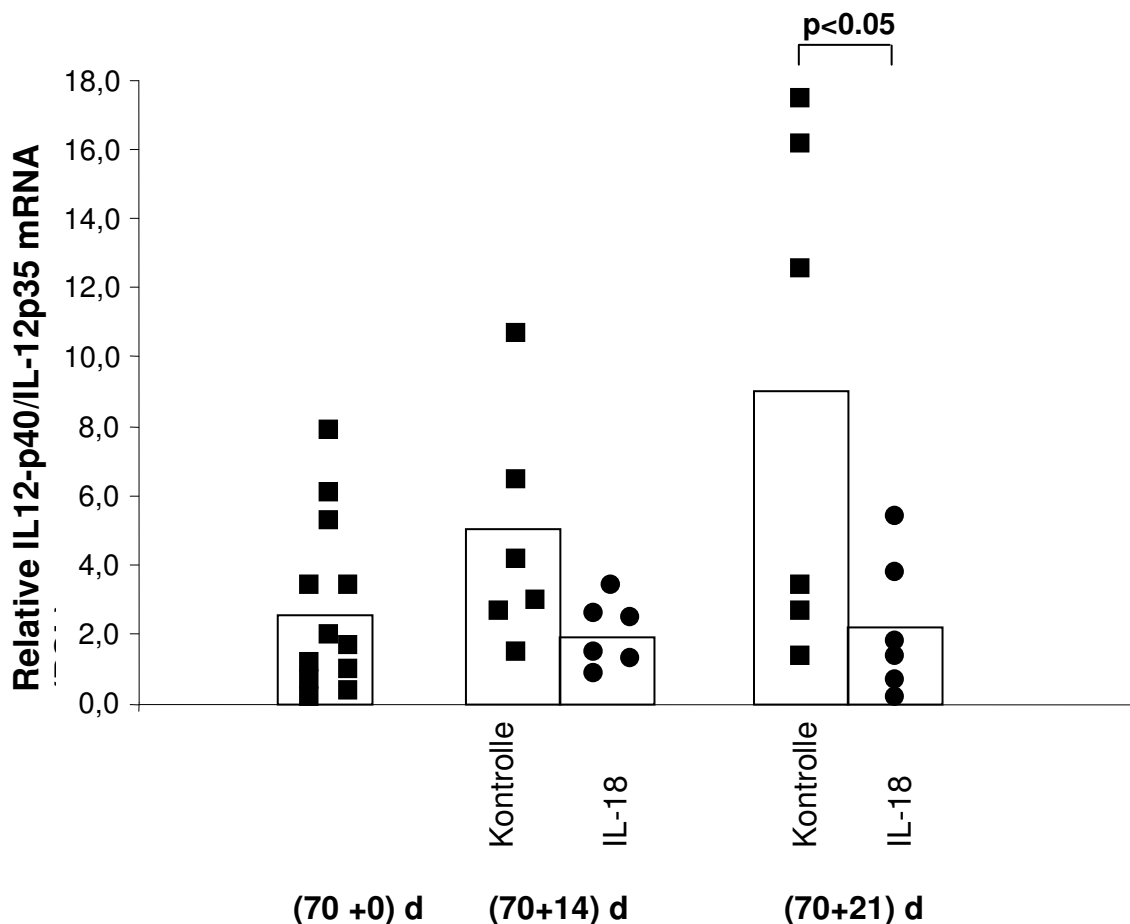


Abb.9: IL-12p40/IL-12p35 mRNA Expression in den Pankreata der behandelten und kontroll-behandelten NOD Mäuse an den Tagen, 70+0, 70+14 und 70+21. Die Einzelwerte stellen die relative Quantität des PCR-Signals von IL-12p40/IL-12p35 als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten der individuellen Mäuse dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.3.3 iNOS mRNA Expression

Am Tag 14 und 21 nach Behandlungsbeginn nahm die Expression der iNOS mRNA in der kontroll-behandelten Gruppe der NOD Mäuse zu, während es bei den mit IL 18 behandelten Tieren an Tag 14 ($p < 0.005$) und Tag 21 ($p < 0.05$) zu einer signifikanten Reduktion kam. IL-18 zeigte keinen wesentlichen erkennbaren Einfluss auf die iNOS mRNA Expression der Balb/c Mäuse. (Abb. 10)

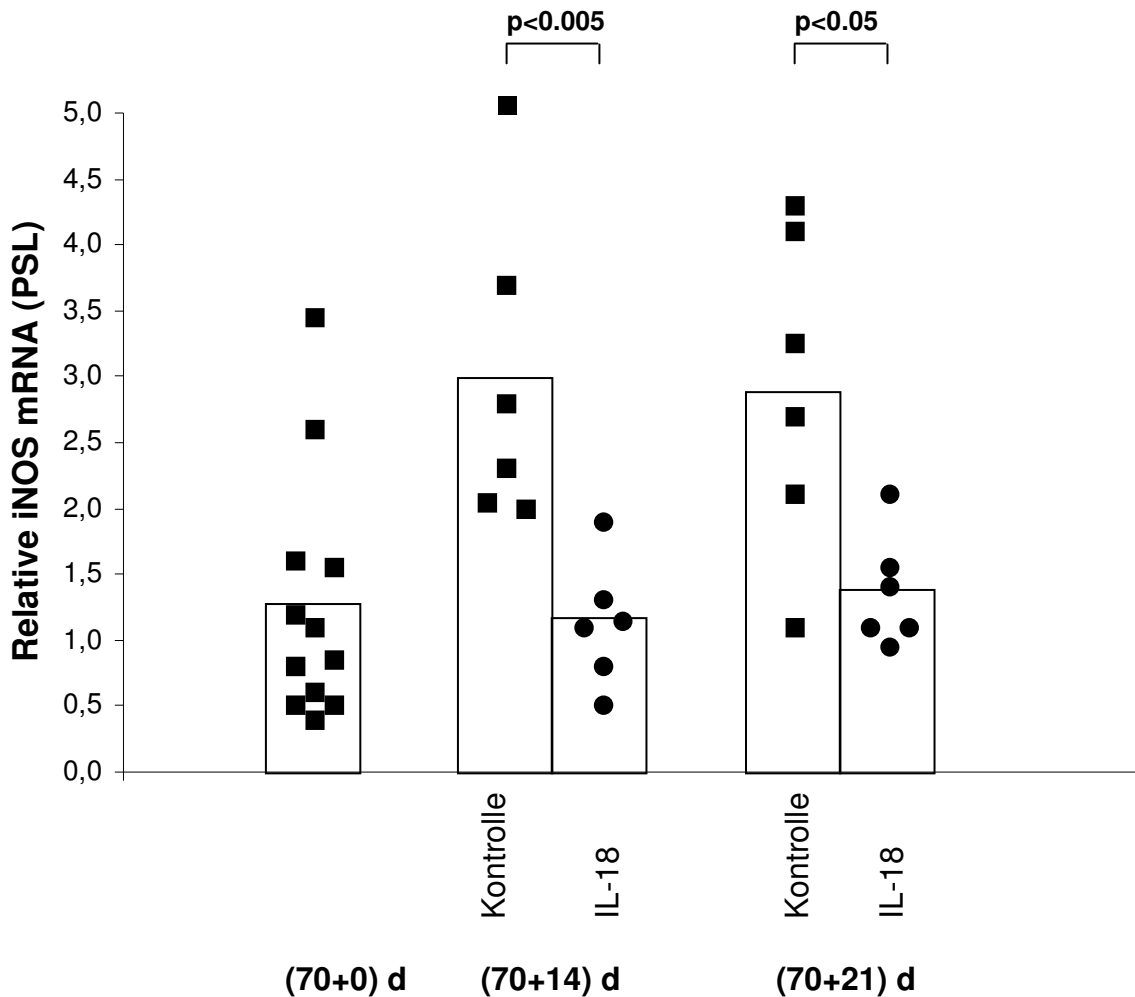


Abb.10: iNOS mRNA Expression in den Pankreata der behandelten und kontrollbehandelten NOD Mäuse an den Tagen 70+0, 70+14 und 70+21. Die Einzelwerte stellen die relative Quantität des PCR-Signals von iNOS als PSL-Werte nach Normalisierung mit den jeweiligen β -Aktinwerten der individuellen Mäuse dar. Die Höhe des Balkens zeigt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Balb/c Mäuse nicht abgebildet.

4.3.4 Korrelation von iNOS mRNA Expression mit IFN γ /IL-10 und IFN γ /IL-4 mRNA Expression sowie destruktiver Intrainsulinitis

Es zeigte sich, dass kontroll-behandelte NOD-Mäuse mit einem zur Th1-Seite verschobenen Verhältnis der mRNA Expression, also mit hohen Werten der Verhältnisse IFN γ /IL-10 und IFN γ /IL-4, eine hohe iNOS mRNA Expression aufweisen.

Die Korrelation zwischen der iNOS mRNA Expression und der Ratio IFN γ /IL 10 wurde mit $r=0.83$ ($p<0.05$) für alle Tiere berechnet. Unter Ausschluss der höchsten Werte mit $r = 0.77$ ($p<0.05$).

Die Korrelation zwischen der iNOS mRNA Expression und der Ratio aus IFN γ /IL-4 ergab $r=0.94$ ($p<0.01$) für alle Tiere.

Ferner zeigte sich eine enge Korrelation mit der Höhe der iNOS mRNA Expression und dem Ausmaß der Intrainsulinitis am Tag 21 nach Behandlungsbeginn bei den kontroll-behandelten NOD-Mäusen ($p< 0,01$).

5.) Diskussion:

5.1 Der Einfluss von IL-18 auf den Diabetesverlauf der NOD-Maus

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein zum Untersuchungszeitpunkt neues, potentiell proinflammatorisches Zytokin, IL-18, systemisch in einem Tiermodell des Typ I D.m., der NOD-Maus, verabreicht. Gemäß der in *Kapitel 1.3* formulierten Arbeitshypothese erwarteten wir eine Beschleunigung der Diabetesentwicklung, als klinisches Korrelat einer aggressiveren Intrainsulinitis. Damit einhergehend wäre ein zur Th1-Seite verschobenes Gleichgewicht der T-Helferzellen zu erwarten gewesen.

IL-18 wirkte, entgegen der ursprünglichen Hypothese, in unseren Experimenten antiinflammatorisch.

5.1.1 Der Einfluss von IL-18 auf den klinischen Diabetesverlauf der NOD-Mäuse

Die Verabreichung proinflammatorischen Zytokins IL-18 in der prädiabetischen Phase der diabetes-suszeptiblen NOD-Maus, ließ zunächst einen beschleunigten Verlauf der Erkrankung erwarten. Es zeigte sich jedoch, dass die IL-18 behandelten NOD-Mäuse sowohl einen deutlich verzögerten Beginn des manifesten Diabetes, als auch eine niedrigere Inzidenz im Vergleich zu den unbehandelten NOD-Mäusen aufwiesen.

Ursächlich hierfür ist eine Gegenregulation des Immunsystems: Statt einer zunehmenden Th1-Zell dominierten Zerstörung der pankreatischen β -Zellen mit nachfolgender Diabetesmanifestation persistiert zunächst die Th2-Dominanz in den NOD-Mäusen unter IL-18 Gabe. Ähnliche Effekte sind auch für die systemische Gabe von IL-12 und TNF- α beschrieben (*Trembleau S. 1995; O'Hara R. 1996; Seino H. 1994; Campbell I. 1991*). Insbesondere bei der Behandlung mit IL-12 zeigt sich, dass niedrige Dosen die Diabetesentwicklung unterdrücken können, während höhere sie beschleunigen (*Trembleau S. 1995; O'Hara R. 1996*).

Auch im Modell des Cyclophosphamid-beschleunigten Diabetes bei der NOD-Maus, führte die Behandlung mit IL-18 zu einer Unterdrückung der Diabetes-Entstehung (*Tokui et al. 1998*).

Der hier beobachtete Einfluss scheint also auch unter veränderten Versuchsbedingungen reproduzierbar zu sein und nicht ausschließlich vom Versuchsprotokoll und der verwendeten NOD-Maus-Kolonie abhängig zu sein.

5.1.2 Der Einfluss von IL-18 auf die entzündlichen Veränderungen in den Pankreata der NOD-Mäuse

Die klinischen Beobachtungen einer verzögerten bzw. verminderten Diabetesentwicklung spiegelte sich auch in den histologischen Untersuchungen der Pankreata der Versuchstiere wieder. Vor der Behandlung mit IL-18 zeigten die meisten prädiabetischen NOD-Mäusen mehr Inseln mit Intrainsulitis als mit Periinsulitis. Bei den kontrollbehandelten Tieren kam es an den Zeitpunkten 14 und 21 Tage nochmals zu einer deutlichen Zunahme der von einer aggressiven Insulitis befallenen Inseln. Im Gegensatz dazu war bei den IL-18 behandelten Mäusen keine Zunahme der Inselinfiltration im Verlauf des Experiments zu beobachten. Es kam vielmehr zu einer Abnahme des Insulitisscores 14 und 21 Tage nach Behandlungsbeginn im Vergleich zu den 70 Tage alten Mäusen.

Der Übergang von der benignen Periinsulitis zur aggressiv destruktiven Intrainsulitis mit nachfolgender Diabetesentwicklung ist ein Th1-Zell dominierter Prozess. Somit ist davon auszugehen, dass die exogene Zufuhr von IL-18 in diesem Experiment den bei der NOD-Maus natürlichen Übergang zur destruktiven Intrainsulitis aufgehalten hat. IL-18 hat das Gleichgewicht zugunsten der Th2-Zellen verschoben und somit den Th1 dominierten Zerstörungsprozess aufgehalten.

Dieser Effekt nicht auf einen direkten Einfluss von IL-18 auf die pankratischen Zellen zurückzuführen ist, sondern T-Zell vermittelt. s.u. (Rothe H. 1998).

5.1.3 Der Einfluss von IL-18 auf die mRNA Expression immunregulatorischer Zytokine.

5.1.3.1 Die T-Helferzell-Zytokine IFN γ , IL-10 und IL-4

Neben den klinischen und histologischen Befunden wurde auch der Einfluss von IL-18 auf das Zytokinmuster immunregulatorischer Zellen im Rahmen der Insulitis untersucht. Als Methode hierfür wurde die Bestimmung der Zytokin mRNA Expression im Gesamtpankreas gewählt. Die alternative Methode der Isolation von Inseln aus den Pankreata und der anschließenden mRNA Aufarbeitung würde durch eine niedrigere

Ausbeute an Inselzellen bei Tieren mit einer fortgeschrittenen Intrainsulitis und einem höheren Verlust an periduktulären und periinsulären Leukozyten während des Aufbereitungsprozesses zu Fehlinterpretationen führen. Es käme zu einer Präparationsbedingten quantitativen Überbewertung der intrainsulären Leukozyten. Vorausgegangene Studien konnten die enge Korrelation zwischen den Zytokin mRNA Mengen im Gesamtpankreas und den durchschnittlichen Insulitisgraden der Einzeltiere zeigen (Ding A. 1988). Zudem gibt es eine enge Korrelation zwischen Gesamtpankreas mRNA und den immunhistochemischen Färbungen der Zytokine in den gleichen Pankreata (Rothe H.1994).

Nach Aufbereitung der Gesamtpankreas-RNA wurden in einem ersten Schritt der Einfluss von IL-18 auf das Th1-Zytokin IFN γ untersucht. Sowohl bei den kontrollbehandelten NOD-Mäusen an Tag 21 als auch bei den normoglykämischen IL-18 behandelten Tieren zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA Expression. Es war folglich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren hinsichtlich dieses Th1-Zytokins festzustellen.

Ebenso war die Genexpression von IL-10 sowohl bei den IL-18 behandelten als auch bei den kontroll-behandelten NOD-Mäusen an den Tagen 14 und 21 nach Behandlungsbeginn nicht erkennbar verändert.

Der signifikante Einfluss der IL-18 Behandlung wurde erst durch einen direkten Vergleich des Th1- (IFN γ) und des Th2-Zytokins (IL-10) in den individuellen Tieren am jeweiligen Untersuchungszeitpunkt erkennbar. Die zuvor verwendeten Mittelwerte der jeweils sechs Tiere umfassenden Gruppen zeigten diesen Effekt nicht. Die Bestimmung des Verhältnisses IFN γ /IL-10 in den individuellen Tieren zeigte bei den kontrollbehandelten NOD-Mäusen einen deutlichen Anstieg dieses Verhältnisses an den Untersuchungszeitpunkten 14 und 21 Tage, während er bei den IL-18 behandelten Mäusen ausblieb.

Der zuvor klinisch und histologisch postulierte Wechsel von der benignen Periinsulitis hin zur aggressiv-destruktiven Th1-dominierten Intrainsulitis ließ sich auf der Ebene der Zytokin-Genexpression bei den individuellen Tiere ebenfalls nachweisen.

Bei der Genexpressionsanalyse eines weiteren Th2-Zytokins, IL-4, zeigte sich dieser Effekt bereits im Gruppenvergleich. Bei den IL-18 behandelten NOD-Mäusen war ein deutlicher Anstieg dieses Th2-Zytokins an Tag 21 zu beobachten. Als Konsequenz zeigte

sich dieses Resultat auch bei der Berechnung des individuellen IFN γ /IL-4 mRNA-Verhältnisses.

Es konnte also mittels der Analyse eines weiteren T-Helferzell-Zytokins gezeigt werden, dass die systemische Gabe von IL-18 den Übergang zur Th1-dominierten Intrainsulinitis verhindert.

Die Analyse der pankreatischen mRNA an den Untersuchungszeitpunkten 0, 14 und 21 Tage zeigte eine deutliche Progression der Entzündungsreaktion mit einer Th1-Zelldominanz ausgedrückt durch das ansteigende IFN γ /IL-10 mRNA und IFN γ /IL-4 mRNA Verhältnis. IL-18 behandelte Tiere zeigten diese Progression jedoch nicht. Daraus ist zu schließen, dass die exogene Gabe von IL-18 den natürlichen Th1-Shift bei der NOD Maus verhindern kann und damit die destruktive Insulinitis unterdrückt. Diese Schlussfolgerung geht mit den histologischen Befunden der Insulitisgrade einher, die eine deutlich geringere Intrainsulinitis der IL-18 behandelten NOD-Mäuse zeigten.

5.1.3.2 Die Zytokine des angeborenen Immunsystems IL-12 und IL-18

Neben der Analyse der T-Helferzell Zytokine wurde in dieser Arbeit der Einfluss der exogenen IL-18 Applikation auf die mRNA-Expression der Zytokine der angeborenen Immunität IL-12 und IL-18 untersucht. Sowohl für IL-12 (*Trembleau 1995*), als auch für IL-18 (*Rothe H. 1997*) ist ein der endogene proinflammatorische Einfluss auf die inselinfiltrierenden Th-Zellen beschrieben. Exogen appliziertes IL-12 zeigte ebenfalls einen deutlichen proinflammatorischen Effekt (*Trembleau 1995*). Die Applikation des Homodimers IL-12(p40)₂ dem Antagonisten des proinflammatorischen IL12p40/p35 zeigte entsprechend eine deutliche Suppression der Diabetsentwicklung und eben auch der Expression von IL-12 mRNA (*Rothe H. 1997*).

In dieser Arbeit wurde das Verhältnis der IL-12p40/IL-12p35 mRNA Expression an den Untersuchungszeitpunkten 14 und 21 Tage der individuellen Tiere bestimmt. Die Gruppe der IL-18 behandelten NOD-Mäuse zeigte keinen Anstieg dieses Verhältnisses und ebenfalls keinen Anstieg der endogenen IL-18 mRNA Expression, während die kontroll-behandelten NOD-Mäuse an Tag 21 einen signifikanten Anstieg zeigten. Exogen appliziertes IL-18 ist also in der Lage, die endogene Expression des proinflammatorischen Zytokinverhältnisses IL-12p40/IL-12p35 und IL-18 herunterzuregulieren.

Im Gegensatz zu der o.g. Arbeit von Trembleau ist auch für die exogene Gabe von IL-12 bereits eine deutliche reduzierte Diabetesinzidenz beobachtet worden, die endogene IL-12 mRNA Expression wurde jedoch nicht untersucht (*O'Hara 1996*).

Beide proinflammatorischen Zytokine scheinen also unter bestimmten Bedingungen auch in der Lage zu sein, antiinflammatorisch zu wirken.

Das Herunterregulieren des endogenen Th1-vermittelnden Zytokins IL-18 könnte das Ergebnis eines Effekts auf die Makrophagen oder eine Konsequenz der verminderten Th1-Reaktivität, die wiederum in einem kleineren IFN γ /IL-10 mRNA Verhältnis resultiert, sein. Aufgrund anderer Arbeiten kann angenommen werden, dass dieser Effekt durch eine Stimulation von Th2-Zell-Zytokinen durch exogen appliziertes IL-18 bei Zellen der angeborenen Immunität zustande kommt (*Micallef, M.J.T. 1998 34*).

Die Expression dieser beiden Zytokine korrelierte signifikant bei den individuellen Tieren. Ebenfalls korrelierte das Ausmaß der Intransulitis signifikant mit der IL-18 und IL-12-Expression.

5.1.3.3 Die iNOS-Expression

NO ist einer der Haupteffektoren der β -Zellzerstörung. Die vermehrte Expression der induzierbaren NO-Synthase mit konsekutiv zunehmender NO-Produktion und destruktiver Intransulitis ist ein wesentlicher Pathomechanismus der Inselzellzerstörung. Der enge Zusammenhang zwischen pankreatischer iNOS mRNA-Expression und destruktiver Intransulitis ist bekannt (*Rothe H. 1994, Kolb H. 1996*). Die iNOS mRNA Expression kann durch inflammatorische Zytokine wie IFN γ , IL-1 β und TNF α in Makrophagen, Endothelzellen und β -Zellen induziert werden; Th2-Zytokine wirken hingegen inhibierend (*Ding A.H., 1988, Southern C. 1990, Suschek C. 1993*). Ferner ist die iNOS Expression ein Marker für die Makrophagen Aktivierung.

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass die systemische Applikation von IL-18 zu einer signifikanten Reduktion der iNOS Expression an den Untersuchungszeitpunkten 14 und 21 Tage führte. Die unbehandelten Tiere zeigten im gleichen Zeitraum eine Zunahme der Expression. Es konnte erneut gezeigt werden, dass eine hohe iNOS Expression mit einem hohen Grad an Intransulitis korrelierte. Zudem ließ sich eine enge Korrelation zwischen iNOS mRNA Expression und dem Anstieg des Verhältnisses

IFN γ /IL-10 mRNA bzw. IFN γ /IL-4 mRNA in den individuellen Tieren feststellen. Dies bedeutet, dass Tiere mit einer Verschiebung des T-Helferzell Gleichgewichts zur proinflammatorischen Th1 Zelle auch eine deutlich höhere iNOS Expression als Marker für die destruktive Insulitis zeigten.

5.2 Modulation des autoimmunen Geschehens durch IL-18

Die systemische Applikation von IL-18 führte im klinischen Verlauf, auf histologischer Ebene und hinsichtlich der mRNA Expression Th1/Th2-relevanter Zytokine zu einer Unterdrückung des diabetogenen Prozesses bei der NOD-Maus. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich erneut, dass eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen proinflammatorischen Th1-Zellen und nicht aggressiven Th2-Zellen als ursächlich für diese Beobachtungen anzusehen ist.

Eine ursächliche Beeinflussung dieses Gleichgewichts durch Zytokine konnte in einer Reihe von Arbeiten gezeigt werden: Trembleau et. al. und O'Hara et.al. zeigten die Verschiebung zur Th1-Seite und die Beschleunigung der Diabetesentstehung unter IL-12-Gabe; Micallef et al. und Rothe et al. beschreiben bereits die IGIF Wirkung auf Th1-Zytokine und Tokui et al. beschreiben die Unterdrückung der Diabetesentstehung durch IL-18 im Cyclophosphamid akzelerierten Diabetes der NOD-Maus; (*Trembleau S. 1995, O'Hara 1996, Micallef M.J. 1996, Rothe H. 1994, Tokui M. 1998*). Die Verschiebung dieses Gleichgewichtes ist der entscheidende immunologische Pathomechanismus der Zerstörung der pankreatischen Inseln und der Diabetes Manifestation. Da die systemische Applikation von IL-18 zur Unterdrückung der fortschreitenden Insulitis mit Betazelluntergang und der Diabetesmanifestation führte, ist zu postulieren, dass die Th1-Reaktion ebenfalls unterdrückt wurde. Dieses wurde durch die Ergebnisse der mRNA Analysen bestätigt.

Ein mögliches Gegenargument für diese Hypothese wäre, dass IL-18 einen direkten Einfluss auf die pankreatischen Inselzellen unter Beteiligung anderer inflammatorischer Zytokine und ohne Bedeutung der T-Helferzellaktivität haben könnte. IL-18 hat jedoch anscheinend keinen direkten Einfluss auf die Inselzellen (*Rothe H. 1999*):

IL-1 β , TNF- α und IFN γ sind in der Lage die Freisetzung von NO, dem wesentlichen Effektor der Betazell-Zerstörung in experimentellen Systemen des Typ1 D.m. zu induzieren (*Kolb H. 1992*). Erwartungsgemäß führen niedrige Konzentrationen von IL-1 β zu

Freisetzung moderater Mengen an NO und üben einen stimulatorischen Effekt auf den Inselzellmetabolismus aus (*Spinas G. 1986 und 1987*). Werden pankreatische Inseln hingegen einer Kombination aus IL-1 β , TNF- α und IFN γ ausgesetzt, kommt es zur Bildung hoher NO Mengen, deren toxischer Effekt durch eine starke Senkung der respiratorischen Aktivität der Inselzellen gezeigt werden konnte (*Cetkovic-Cvrlje M. 1994, Burkart V. 1996*). Die Zugabe von IL-18 zeigte keinen zusätzlichen Effekt, weder stimulatorisch noch inhibitorisch, auf die Freisetzung von NO und die durch die anderen Zytokine verursachte mitochondriale Aktivität (*Rothe H. 1999*).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass IL-18 keinen direkten Effekt auf pankreatische Inselzellen hat und auch nicht in der Lage ist, direkt protektiv oder sensibilisierend in Bezug auf andere Entzündungsmediatoren zu wirken.

Systemisch appliziertes IL-18 unterdrückt also wahrscheinlich über eine Dämpfung der Th1-Reaktivität die Diabetes Entwicklung in unseren Experimenten. Darüber hinaus zeigt die erniedrigte iNOS Expression der IL-18 behandelten NOD-Mäuse eine geringere Aktivierung proinflammatorischer Zellen (Makophagen), mit der Folge einer geringeren Betazell-Zerstörung und einer geringeren Diabetesinzidenz. IL-18, als ein Zytokin des angeborenen Immunsystems, zeigte einen immunmodulatorischen Einfluss auf das erlernte T-Zell abhängige Regulationssystem eines autoimmunen Krankheitsprozesses.

Tokui et al. konnten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Cyclophosphamid akzelerierte Diabetesentwicklung bei der NOD Maus zeigen (*Tokui M. 1998*), während Oikawa et al. zeigten, dass IL-18 auch in der Lage ist, eine Th1-Reaktion auszulösen und die Diabetes-Inzidenz der NOD-Maus zu erhöhen. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Experimenten, bei denen IL-18 in der 10. Entwicklungswoche gegeben wurde, erfolgte die Applikation in Oikawas Experimenten zu einem viel früheren Zeitpunkt, in der 4. Entwicklungswoche der NOD-Mäuse. Hier könnte eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Wirkungen liegen oder aber auch in einem kostimulatorischen Effekt von erhöhten IL-12 Spiegeln, CD86 und IFN-induzierbaren Protein-10 mRNA Spiegeln (*Oikawa 2003*).

IL-18 scheint wie z.B. IL-12 und andere Zytokine IFN γ und TNF α (*Campbell 1991*) kein einfacher pro- oder anti- inflammatorischer Spieler des Immunsystems zu sein, sondern in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu, vom Aktivierungsniveau und Zeitpunkt des

inflammatorischen Geschehens beeinflusst, zu agieren. Diese Hypothese wird von einer Arbeit von Nakanishi et al aus dem Jahre 2001 gestützt. Hier wurden multiple Einflüsse von IL-18 auf Lymphozyten (insbesondere auch auf T-Helferzellsubpopulationen), die Rolle bei Infekt- und Tumorabwehr, sowie bei atopischen Reaktionen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL-18 ein Zytokin ist, dass als Teil des angeborenen Immunsystems sowohl Th1- als auch Th2-dominierte Immunreaktionen steuernd beeinflusst (*Nakanishi 2001*).

Es zeigte sich in diesen Experimenten, dass IL-18, ein zunächst als rein proinflammatorisch beurteiltes Zytokin, auch die entgegengesetzte Wirkung entfalten kann. Eine Fülle begleitender Faktoren wie der Zeitpunkt der Applikation, das Aktivierungsmuster der Th-Zellen sowie die Spiegel anderer steuernder Zytokine scheint Bedeutung für die Art der Reaktion zu haben. Dies führt dazu, dass man zum gegenwärtigen Zeitpunkt aus dieser Beobachtung keine einfache therapeutische Konsequenz für den Menschen ziehen kann.

Dennoch könnten diese Beobachtungen in Zukunft helfen, Risikopatienten zu definieren, die einer immunmodulatorischen Therapie unterzogen werden könnten. So zeigt eine Arbeit einen engen Zusammenhang zwischen Inselzellautoantikörpern und dem Status der systemischen Immunregulation, insbesondere der Höhe des IL-18 Spiegels (*Hanifi-Moghaddam 2003*). Serumspiegel könnten also helfen ein Risikoprofil für die Entwicklung des Diabetes zu entwickeln. Ähnliches zeigt eine Arbeit von Nicoletti et al.: Die IL-18 Serumspiegel sind beim Menschen insbesondere in der Frühphase der Erkrankung erhöht. Auch dies könnte zusammen mit der Bestimmung von Inselzellautoantikörpern helfen, bei Verwandten ersten Grades von Typ 1 Diabetikern ein hohes Risiko für die Entwicklung der Erkrankung in der subklinischen Phase zu erkennen (*Nicoletti 2001*). Zu diesem Zeitpunkt könnte beispielsweise ein immunsuppressiver Therapieversuch unternommen werden.

IL-18 könnte auch als Marker eines Testmodells für neue immunmodulatorische Substanzen eingesetzt werden: Rose et al. zeigten, dass sich eine modifizierte gemischte Lymphozytenkultur als annähernd physiologisches Testmodell für komplexe Autoimmunerkrankungen, die sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem betreffen, verwendet werden kann. Die Zugabe immunmodulatorischer Substanzen führte zu einem starken Anstieg von IL-18 und IL-12 Spiegeln. In diesem System könnten also eine Reihe neuer Substanzen getestet werden (*Rose B. 2004*).

Die im Laufe der Zeit gewonnenen Erkenntnisse über Autoimmunerkrankungen, wie des Typ1 D.m., zeigen ein zunehmend komplexeres Bild der Steuerungsmechanismen des Immunsystems. An Stelle von rein agonistischen oder antagonistischen Zytokinen finden sich solche mit komplexen Wechselwirkungen. Die Erkenntnisse über diese Regulationsmechanismen könnten die Entwicklung diagnostischer Methoden und neuer Substanzen, die gezielt einzelne Elemente der Signalkaskade beeinflussen können, fördern.

6. Zusammenfassung

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist eine Autoimmunerkrankung. Durch eine aggressive Infiltration Langerhans'scher Insel kommt es zur selektiven Zerstörung pankreatischer β -Zellen mit anschließender Diabetes Manifestation. Im Tiermodell der spontandiabetischen NOD-Maus ist die Expression des proinflammatorischen IL-18 Gens frühzeitig im Krankheitsverlauf erhöht.

Diese Arbeit untersuchte die Wirkung der exogenen Applikation des proinflammatorischen Zytokins IL-18 auf den Krankheitsverlauf bei NOD Mäusen gegenüber kontroll-behandelten NOD-Mäusen und nicht diabetischen Balb/c-Mäusen. Die Arbeitshypothese eines beschleunigten Krankheitsverlaufs wurde widerlegt: IL-18 unterdrückte und verzögerte die klinische Manifestation des Diabetes der behandelten NOD-Mäuse gegenüber den kontroll-behandelten NOD-Mäusen. Histologisch zeigte sich eine deutlich schwächer ausgeprägte Insulitis. Das Infiltrationsmuster der benigneren, Th2-dominierten Periinsulitis, überwog bei den IL-18-behandelten, das der aggressiven, Th1-dominierten Intrainsulitis bei den kontroll-behandelten NOD-Mäusen. Die für die Erkrankung kausale T-Helferzell-Balance (Th1/Th2) wurde durch die IL-18 Gabe in Richtung vermehrter nicht autoaggressiver Th2-Zellen verlagert. Das Verhältnis des Th1-Zytokins IFN γ zu den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-10 nahm unter Behandlung signifikant ab. Die endogene proinflammatorische IL-18 Expression nahm bei den kontrollbehandelten im Vergleich zu den IL-18 behandelten Tieren deutlich zu. Das ebenfalls proinflammatorische Zytokin IL-12 (sowie das Verhältnisses IL-12p40/IL-12p35) des angeborenen Immunsystems zeigte auch eine verminderte Expression unter Behandlung. Die induzierbare Synthese des zytotoxischen Stickstoffmonoxids iNOS ist ein Haupteffektor der β -Zell-Zerstörung. Sie wird bei der Th1-dominierten aggressiven Intrainsulitis vermehrt exprimiert und beschleunigt die Erkrankung. Bei den IL-18 behandelten Mäusen stieg sie im Gegensatz zu den kontroll-behandelten Tieren nicht an.

Exogen systemisch appliziertes IL-18, ein potentiell proinflammatorisches Zytokin, hemmt im Modell der spontandiabetischen NOD-Maus, über die Verlagerung der T-Helferzell Balance zu einer Dominanz der Th2-Zellen, den Autoimmunprozess, der ursächlich für die Entstehung des Typ 1 Diabetes ist. Neben den bisher beschriebenen proinflammatorischen, kann es somit auch antiinflammatorische Eigenschaften zeigen.

7. Literaturverzeichnis

Alfoso L.C.C., Scharton T.M., Vieira L.O., Wysocka M., Trinchieri G., Scott P.

The adjuvant effect of IL-12 in a vaccine against *Leishmania major*.

Science **1994** 263, 235-237

Allen P.M., Unanue E.R.

Antigen processing and presentation at a molecular level.

Adv Exp Med Biol **1987** 225, 2249-2254

Appels B., Burkart V., Kantwerk-Funke G., Kolb-Bachofen V., Kolb H.

Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells.

J Immunol **1989** 142, 3803-3808

Archa-Orbea H., McDevitt H.O.

The first external domain of the non-obese diabetes class II IAB chain is unique.

Proc Natl Acad Sci USA **1987** 84, 2435-2441

Bazan J.F., Timans J.C., Kastelein R.A.

A newly defined interleukin-1?

Nature **1996** 379, 591

Berger W., Gries F.A., Koschinsky T., Toeller M.

"Diabetes mellitus" in "Lehrbuch der Inneren Medizin" (Hrsg.: Siegenthaler W., Kaufmann W. et al.; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York **1984**

Bergmann L., Kröncke K.D., Suschek C., Kolb H., Kolb-Bachofen V.

Cytotoxic action of IL-1 β against pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase.

Endocrinology **1992** 129, 103-106

Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C.

Macrophage deactivation by IL-10.

J Exp Med **1991** 174, 1549-1555

Burkhart V., Brenner H.H., Hartmann B., Kolb H.

Metabolic activation of islet cells improves resistance against oxygen radicals or streptozotocin, but not nitric oxide.

J. Clin. Endocrinol. Metabol. **1996** 81; 3966

Campbell I.L., Oxbrow L., Harrison L.C.

Reduction of insulinitis following administration of IFN γ and TNF α in the NOD mouse.

J Autoimmunity **1991** 4, 249-262

Castano L., Eisenbarth G.S.

Type 1 diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat.

Ann Rev Immunol **1990** 8, 647-679

Cetkovic-Cvrlje M., Eizirik D.L.

TNF- α and IFN- γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide.

Cytokine **1994** 6; 399

Charlton B., Bancelj B.A., Mandel T.E.

Administration of silica particulates or anti-Lyt2-antibodies prevents β -cell destruction in NOD mice given cyclophosphamid.

Diabetes **1988** 37, 930-936

Cher D.J., Mosmann T.R.

Two types of murine helper T cell clone: Delayed tape hypersensitivity is mediated by Th1 clones.

J Immunol **1987** 138, 3688-3694

Chomarat P., Rissoan M.C., Miossec P.

IFN γ inhibits IL-10 production by monocytes.

J Exp Med **1993** 177, 523-527

Chomczynski P., Sacchi N.

Single step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform extraction.

Anal Biochemistry **1987** 162, 156-159

Corbett J.A., Lancaster J.R., Mc Daniel M.L.

IL-1 β induced formation of iron-nitrosyl complexes in islets of Langerhans.

J Biol Chem **1991** 266, 21351-21354

D`Andrea A., Aste-Amezaga M., Ma X., Kubin M., Trinchieri G.

IL-10 inhibits human lymphocyte IFN γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.

J Exp Med **1993** 178, 1041-1048

De Waal M.R., Abrams J., De Vries J.

IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.

J Exp Med **1991** 174, 1209-1220

De Waal M.R., Haanen J., Yssel H., De Vries J.E.

IL-10 strongly reduces antigen-specific T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II MHC expression.

J Exp Med **1991** 174, 915-924

Ding A.H., Nathan C.F., Stühr D.J.

Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production.

J Immunol **1988** 141, 2407-2412

Faust A., Burkart V., Ulrich H., Weischer C.H., Kolb H.

Effect of lipoic acid on cyclophosphamid induced diabetes and insulinitis in NOD mice.

Int J Immunopharmacology **1994** 16, 61-66

Fehsel K., Jalowy A., Sun Q., Burkart V., Hartmann B., Kolb H.

Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide.

Diabetes **1993** 42, 496-500

Feinberg A., Vogelstein

Anal. Biochemistry **1983** 132, 6-13

Feinberg A., Vogelstein

Anal. Biochemistry **1984** 137, 266-267

Fiorentino D.F., Zlotnik A., Viera P., Mosmann T.R., Moore K.W.

IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th 1 cells.

J Immunol **1991** 146, 3444-3451

Gepts W., In't Velt P.A.

Islet morphologic changes.

Diabetes-Met Rev **1987** 3, 859-872

Germann T., Hess H., Szeliga J., Rude E.

The effects of IL-12 and IL-12-inhibitors in the collagen induced arthritis model
in "IL-12: cellular and molecular immunology of an important regulatory cytokine"

(Hrsg.: Lotze M.T., Trinchieri G., Gately M.)

New York Academy of Science Press **1996** 795, 241-249

Gillessen S., Carvajal D., Ling P., Podlasky F.J., Stremlo D.L., Familetti P.C., Gubler U., Presky D.H., Stern A.S., Gately M.K.

Mouse interleukin-12 p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist.

Eur J Immunol **1995** 25, 200-206

Hahnenberg H., Kolb-Bachofen V., Kantwerk-Funke G., Kolb H.

Macrophage infiltration precedes and is prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of prediabetic B6rats.

Diabetologia **1989** 32, 126-129

Hanifi-Moghaddam P., Schloot N.C., Kappler S., Seissler J., Kolb H.

An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes.

Diabetes **2003** May, 52(5); 1137-42

Harada M., Makino S.

Promotion of spontaneous diabetes in NOD mice by cyclophosphamid.

Diabetologia **1984** 27, 604-606

Haskins K., McDuffie M.

Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet specific T cell clone.

Science **1990** 249, 1433-1436

Healey D., Ozegbe P., Arden S., Chandler P., Hutchton J., Cooke A.

In vivo and in vitro specificity of CD 4+ Th 1 and Th 2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice.

J Clin Invest **1995** 95, 2979-2985

Herold G. und Mitarbeiter

"Endokrinologie/ Diabetes mellitus" in *Innere Medizin*"

Eigenverlag **2004**

Horio F., Fukuda M., Katoh M., Petruzelli M., Yano C., Rittershaus C., Bonner-Weir S., Hattori M.

Reactive oxygen intermediates in autoimmune islet cell destruction of the NOD mouse induced by peritoneal exudate cells (rich in macrophages) but not T cells.

Diabetologia **1994** 37, 22-31

Hutchings P., Rosen H., O'Reilly L., Simpson E., Gordon S., Cooke A.

Transfer of diabetes in mice is prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages.

Nature **1990** 348, 639-642

Jansen A., Homo-Delarche F., Leenen P.J., Dardenne M., Drexhage H.A.

Immunohistochemical characterization of monocyte-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and β -cell destruction in NOD mice.

Diabetes **1994** 43, 667-675

Jun C.D., Choi B.M., Kim S.U., Chung H.T.

Down regulation of TGF β increases IFN γ -induced NO-synthesis in macrophages.

Immunology **1995** 85, 114-119

Katz J.D., Benoist C., Mathis D.

T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes.

Science **1995** 268, 1185-1188

Kawasaki E.S.

Amplification of RNA

"PCR protocols, a guide to methods and applications" (Hrsg.: Innis et al.)

Academic Press **1991** S.21-27

Koevary S., Rossini A.A., Stoller W., Chick W., Williams R.

Passive transfer of diabetes in the BB rat.

Science **1983** 220, 727-728

Kolb-Bachofen V., Kolb H.

A role for macrophages in the pathogenesis of type 1 diabetes.

Autoimmunity **1989** 3, 145-155

Kolb H., Kolb-Bachofen V.

Type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus and nitric oxide.

Diabetologia **1992** 35, 796-797

Kolb H., Kolb-Bachofen V.

Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity

Immunol. Today **1992** 13:157

Kolb H., Krüger G., Gries F.A., Bellmann O.

Islet cell antibodies: which method?

Lancet **1983** 1, 479-480

Kolb H., Wörtz-Pagenstert U., Kleemann R., Rothe H., Rowsell P., Scott F.W.

Cytokine gene expression in BB rat pancreas: natural course and impact of bacterial vaccines.

Diabetologia **1996** 39, 1448-1454

Kolb H.

Mouse models of IDDM: low dose streptozotocin-induced diabetes and NOD mice

Diabetes-Met Rev **1987** 3, 751-778

Kolb H.

"Diabetes" in "Immunologie" (Hrsg.: Gemsa D., Kalden J.R., Resch K.)

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York **1990** S. 503-511

Kolb H.

Ätiopathogenese und Genetik des Typ 1 Diabetes mellitus in "Diabetes mellitus"

(Hrsg.: Berger W.) Urban und Schwarzenberg Verlag **1995**

Kolb H.

Benign versus destructive insulinitis.

Diabetes Met Rev **1997** 13, 139-146

Kröncke K.D., Brenner H.H., Rodriguez M.L., Eitzkorn K., Noack E.A., Kolb H., Kolb-Bachofen V.

Pancreatic islet cells are highly susceptible toward the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide.

Biochem Biophys Acta **1993** 1182, 221-229

Kröncke K.D., Kolb-Bachofen V., Berschick B., Burkart V., Kolb H.

Activated macrophages kill pancreatic syngenic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation.

Biochem Biophys Res Commun **1991** 175, 752-758

Kuglin B., Bertrams J., Kolb H., Gries F.A.

Früherkennung des Typ 1 Diabetes.

Dtsch Med Wschr **1989** 114, 762-767

Kunst A., Draeger B., Ziegenkäm J.

UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Bergemeyer HU "Methods of enzymatic analysis" Weinheim Verlag Chemie **1984** Vol. IV 172-178

Lee K.U., Amano K., Yoon J.W.

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

Diabetes **1989** 37, 989-991

Liew F.Y., Millot S., Li Y., Chan W.L., Ziltener H.

Macrophage activation by IFN γ from T cells is inhibited by IL-4 produced by T cells.

Eur J Immunol **1989** 19, 1227-1232

Makino S., Tochino Y.

The spontaneously non-obese-diabetic mouse.

Exp Anim **1978** 27, 27-32

Mandrup-Poulson T., Bendtzen K., Nerup J., Dinarello C.A., Svenson M., Nielson J.H.

Affinity purified human interleukin-1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans.

Diabetologia **1986** 29, 63-67

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.

Molecular Cloning; A laboratory manual

Cold Spring Harbour University Press **1989**

Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccini M.P., Maggi E., Trinchieri G.

Natural killer cell stimulatory factor (IL-12) induces T-helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th-cells.

J Exp Med **1993** 177, 1199-1204

Mattner F., Fischer S., Guckes S., Jin S., Kaulen H., Rude E., Germann T.

The interleukin-12 p40 subunit specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer.

Eur J Immunol **1993** 23, 2203-2208

McLaren N., Schatz D., Drasch A., Grave G.

Conference summary: Initial pathogenesis in IDDM

Diabetes **1989** 38, 543-548

Mehnert H., Schöffling L.

"Diabetologie in Klinik und Praxis"

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York **1984**

Micallef M.J., Ohtsuki T., Kohno K., Tanabe F., Ushio S., Namba M., Tanimoto T.,

Torigoe K., Fuji M., Ikeda M., Fukuda S., Kurimoto M.

Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production.

Eur J Immunol **1996** 26, 1647-1651

Miller B., Appel M.C., Wicker L.S.

Both the Lyt2+ and L3T4+ cell subsets are required for diabetes transfer in NOD mice.

J Immunol **1988** 140, 52-58

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.

Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology

Pharmacol Rev **1991** 43, 109-134

Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffmann R.L.

Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins.

J Immunol **1986** 136, 2348-2357

Mosmann T.R., Coffmann R.L.

Th 1 and Th 2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.

Ann Rev Immunol **1991** 7, 145-173

Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H.

Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu.

Cytokine Growth Factor Rev. **2001** Mar;12(1); 53-72

Nicoletti F., Meroni P.L., Zanussi C.

Prevention of diabetes in BB rats treated with monoclonal antibodies to IFN γ .

Lancet **1990** 336, 319

Nicoletti F., Conget I., DiMarco R., Speciale A.M., Morinigo R., Bendtzen K., Gomis R.

Serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk for developing type I diabetes.

Diabetologia **2001** Mar; 44(3); 309-11 **NIH publication** No. 85-23, revidierte Fassung
1985

Nolan K.F., Greaves D.R., Waldmann H.

The human IL-18 gene IL-18 maps to 11q22.2-q22.3; Closely linked to DRD2 Gene Locus and distinct from mapped IDDM loci.

Genomics **1998** Vol.51 Issue 1; July 1

O'Hara R.M., Henderson S.L., Nagelin A.

Prevention of a Th 1 disease by a Th 1 cytokine: IL-12 and diabetes in NOD mice. In "IL-12: cellular and molecular immunology of an important regulatory cytokine" (Hrsg.: Lotze M.T., Trinchieri G., Gately M.).

New York Academy of Science Press **1996** 759, 241-249

Oikawa Y., Shimada A., Kasugy A., Morimoto J., Osaki T., Tahara H., Miyazaki T., Tashiro F., Yamato E., Miyazaki J., Saruta T.

Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice.

J. Immunol. **2003** Dec1; 171(11); 5865-75

Okamura H., Tsutsui H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K., Akita K., Namba M., Tanabe F., Konishi K., Fukuda S., Kurimoto M.

Cloning of a new cytokine that induces IFN γ production by T cells.

Nature **1994** 378, 88-91

Oschilewski U., Kiesel U., Kolb H.

Administration of silica prevents diabetes in BB rats.

Diabetes **1985** 34, 197-202

Pennline K.J., Roque-Gaffney E., Monahan M.

Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in NOD mice.

Clin Immunol Immunopathol **1994** 71, 169-175

Powrie F., Menon S., Coffmann R.L.

Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo.

Eur J Immunol **1993** 23, 2223-2229

Pozzilli P., Signore A., Williams A.J., Beales P.

NOD mouse colonies around the world: recent facts and figures.

Immunology Today **1993** 14, 193-196

Prowse S.J., Bellgrau D., Lafferty K.J.

Islet allografts are destroyed by disease occurrence in the spontaneously diabetic B6rat.

Diabetes **1986** 35, 110-114

Pukel C., Baquerizo H., Rabinovitch A.

Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines: synergistic interactions of IFN γ , TNF α , Lymphotoxin and IL-1.

Diabetes **1988** 37, 133-136

Rabinovitch A.

Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM.

Diabetes **1994** 43, 613-621

Radons J., Burkart V., Kolb H.

MHC class II dependent abnormal reactivity towards bacterial superantigens in immune cells of NOD mice.

Diabetes **1997** 45, 379-385

Radons J., Heller B., Bürkle A., Hartmann B., Rodriguez M.L., Kröncke K.D., Burkart V., Kolb H.

Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-Ribose)-polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion.

Biochem Biophys Commun **1994** 199, 1270-1277

Riley W.J., Toskes P.P., McLaren N.K., Silverstein J.H.,

Predictive value of gastric parietal cell autoantibodies as a marker for gastric and hematological abnormalities associated with insulin-dependent diabetes.

Diabetes **1982** 31, 1051-1060

Roep B.O., Duinkerken G., Schreuder G.M.T., Kolb H., Martin S.

HLA associated inverse correlation between T-cell antibody responsiveness to islet autoantigen in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus.

Eur J Immunol **1996** 26, 1285-1291

Roep B.O., Kallan A.A., Hazenbos W.L.W., Bruining G.J., Bailyes E.M., Arden S.D., Hutton J.C., de Vries R.R.P.

T-cell reactivity to a 38kD insulin-secreting-granule protein in patients with recent onset of type 1 diabetes.

Lancet **1991** 337, 1439-1441

Roep B.O., Kallan A.A., de Vries R.R.P

Beta-cell antigen-specific lysis of macrophages by CD4 T-cell clones from newly diagnosed IDDM patients. A putative mechanism of T-Cell-mediated autoimmune islet cell destruction.

Diabetes **1992** 41, 1380-1389

Roll U., Ziegler A.G.

Combined antibody screening for improved prediction of IDDM- Modern strategies.

Exp Clin Endocrinol Diabetes **1997** 105, 1-14

Rose B., Herder C., Loffler H., Kolb H., Martin S.

Combined activation of innate and T cell immunity for recognizing immunomodulatory properties of therapeutic agents.

J. Leukoc. Biol **2004** Apr.;75(4); 624-30

Rosenstock J., Raskin P.

Diabetes and its complications.

Diabetes-Metab Rev **1988** 4, 417-435

Rossini A.A., Mordes J.P., Like A.A.

Immunology of insulin dependent diabetes mellitus.

Ann Rev Immunol **1985** 3, 298-318

Rothe H., Faust A., Schade U., Kleemann R., Bosse G., Hibino T., Martin S., Kolb H.

Cyclophosphamide treatment of female NOD mice causes enhanced expression of iNOS and IFN γ but not IL-4.

Diabetologia **1994** 37, 1154-1158

Rothe H., Fehsel K., Kolb H.

A macrophage defect in diabetes prone B6rats.

Diabetologia **1990** 33, 573-575

Rothe H., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kolb H.

Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near idd2.

J Clin Invest **1997** 99, 469-474

Rothe H., Martin S., Hibino T., Itoh Y., Kolb H.

Systemic production of interferon gamma inducing factor (IGIF) is involved in the development of Th1 insulinitis in NOD mice.

J Autoimmunity **1997** 10, 251-256

Rothe H., O'Hara R., Martin S., Kolb H.

Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)₂.

Diabetologia **1997** 40, 641

**Rothe H., Hausmann A., Casteels K., Okamura H., Kurimoto M., Burkhart V.,
Mathieu C., Kolb H.**

IL-18 inhibits diabetes development in NOD mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis

J. Immunology **1999** 163; 1230-1236

**Seino H., Takahashi K., Satoh J., Zhu X.P., Sagara M., Masuda T., Nobunaga T.,
Funahashi I., Kajikawa T., Toyota T.**

Prevention of autoimmune diabetes with lymphotoxin in NOD mice.

Diabetes **1994** 42, 398-404

Sereeze A., Prochazka M., Reifsnyder P.C., Bridgett M.M., Leiter E.H.

Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice identify a new insulin-dependent diabetes resistant gene.

J Exp Med **1994** 180, 1553-1560

Sher A., Gazzinelli R.T., Oswald I.P., Mosmann T.R.

Role of T cell derived cytokines in down-regulation of immune response.

Immunol Rev **1992** 127, 181-204

Smith, Summers

Anal. Biochemistry **1980**, 123-129

**Spinas G.A., Mandrup-Poulsen T., Molvig J., Baek L., Bendtzen K., Dinarello C.A.,
Nerup J.**

Low concentrations of interleukin-1 stimulate and high concentrations inhibit insulin release from isolated rat islets of Langerhans.

Acta Endocrinol. **1986** 113;551

**Spinas G.A., Hansen B.S., Linde S., Kastern W., Molvig J., Mandrup-Poulsen
T., Dinarello C.A., Nielsen J.H., Nerup J.**

Interleukin 1 dose-dependently affects the biosynthesis of (pro)insulin in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia* **1987** 30; 474

Southern C., Schulster D., Green I.C.

Inhibition of insulin secretion by IL-1 β and TNF α via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism.

FESB Lett **1990** 10; 276, 42-44

Southern E.M. 1975

J. Mol. Biol. **1998** 503-517

Suschek C., Rothe H., Fehsel K., Enczmann J., Kolb-Bachofen V.

Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells.

IL-1 β mediated induction regulated by TNF α and IFN γ .

J Immunol **1993** 15, 3283-3291

Thivolet C., Bendelac A., Bach J.F., Carnaud C.

CD 8+ T cell homing to the pancreas in the NOD mouse is CD 4+ T cell dependent.

J Immunol **1991** 146, 85-88

Tokui M., Shimada O., Funae O., Nomaguchi H., Okamura H., Takei I., Saruta T.

Recombinant IL-18 administration suppresses cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mice.

Diabetes **1998** 47, A9862

Trembleau S., Penna G., Bosi E., Mortara A., Gately M.K., Adorini L.

IL-12 administration induces T-helper Type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice.

J Exp Med **1995** 181, 817-821

Trinchieri G.

Interleukin-12 and its role in the generation of Th 1 cells.

Immunol Today **1993** 14, 335-337

Tripp C.S., Wolf S.F., Unanue E.R.

IL-12 and TNF α are costimulators of IFN γ production by natural killer cells and IL-10 is a physiologic antagonist.

Proc Natl Acad Sci USA **1993** 90, 3725-3729

Voorby H.A.M., Jeucken P.H.M., Kabel P.J., De Haan M., Drexhage H.A.

Dendritic cells and scavenger macrophages in the pancreatic islets of prediabetic BB rats.

Diabetes **1989** 32, 126-129

Weaver C.T., Unanue E.R.

The costimulatory function of antigen presenting cells.

Immunol Today **1990** 11, 49-55

Wicker L.S., Todd J.A., Peterson L.B.

Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse.

Ann Rev Immunol **1995** 13, 179-192

Ziegler A.G., Erhard J., Lampeter E.F., Nagelkerken L.M., Standl E.

Involvement of dendritic cells in early insulinitis of BB rats.

J Autoimmun **1992** 5, 571-579

8. Abkürzungen

Abb.	<u>Abbildung</u>
APC	<u>Antigen Presenting Cell</u>
ATP	<u>AdenosinT</u> riphosphat
Balb/c	nicht-diabetische Kontrollmaus
BSA	<u>Bovines S</u> erum <u>al</u> bumin
CD	<u>Cluster D</u> eterminante
cDNA	<u>complementary D</u> N <u>A</u>
cpm	<u>counts per minute</u>
dATP	<u>Desoxy-A</u> denosin <u>triphosphat</u>
DEPC	<u>Diethylpyrocarbonat</u>
dest.	<u>destilliert</u>
DNA	<u>Desoxyribo</u> nucleic <u>A</u> cid
dNTPs	<u>desoxy-N</u> ukleosid <u>triphosphate</u>
DTM	<u>Desoxyribo</u> nukleotid- <u>Tris-M</u> agnesiumchlorid
DTT	<u>Dithio</u> threitol
g	Erdbeschleunigung
GTC	<u>Guanidin</u> thiocyanat
HLA	<u>Human L</u> euco <u>c</u> yte <u>A</u> ntigen
idd	<u>insulin dependent diabetes-Risikogenregion</u>
IDDM	<u>Insulin D</u> ependent <u>D</u> iabetes <u>M</u> ellitus
IFN γ	<u>Interferon gamma</u>
IGIF	<u>Interferon gamma induzierender Faktor</u>
IL	<u>Interleukin</u>
iNOS	<u>induzierbare NO-Synthase</u>
kb	<u>kilo-basen</u>
MHC	<u>Major H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex
mRNA	<u>messanger R</u> N <u>A</u>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<u>Non-Obese-Diabetes</u> (spontan Typ1 Diabetes Maus)
<i>p</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit (Statistik)
PCR	<u>Polymerase-C</u> hain- <u>R</u> eaction
PSL	<u>Phosphorstimulierte L</u> uminiszenz
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient (Statistik)
RNA	<u>Ribo</u> nucleic <u>A</u> cid
RT	<u>Reverse T</u> ranscription
SDS	<u>Sodiumdodecylsulfat</u>
SSC	<u>Standard-S</u> alin- <u>C</u> itrat
STE	<u>Sodium-Tris-EDTA</u>
Tab.	<u>Tabelle</u>
TBE	<u>Tris-Borsäure-EDTA</u>
TE	<u>Tris-EDTA</u>
Th0 (1,2)	<u>T-Helfer-Zelle Typ0</u> (1,2)

9. Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn *Professor Dr. Hubert Kolb* und Frau *Privatdozentin Dr. Helga Rothe* für das Überlassen des Themas für meine Dissertation.

Den Professoren *H. Okamura* und *M. Kurimoto* für das in Fujisaka synthetisierte und großzügig zur Verfügung gestellte IL-18, das für diese Experimente verwendet worden ist.

Der Abteilung für Endokrinologie an der Katholischen Universität in Leuven/Belgien, insbesondere Frau *Dr. K. Casteels* und Frau *Dr. Ch. Mathieu*, in deren Einrichtung der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit durchgeführt werden konnte.

Frau *Privatdozentin Dr. Helga Rothe*, für die bei der Southern Hybridisierung zur Verfügung gestellten DNA-Templates, ihre stetige Hilfsbereitschaft bei den Experimenten und ihre große Geduld bei meiner Niederschrift dieser Dissertation.

Frau *Waltraut Fingberg* und Herrn *Michael Blendow* für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung.

Herrn *Dr. med. Michael Fiegl* für seine geduldige Unterstützung bei informationstechnologischen Problemen.

Zu guter Letzt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Immunologie* um Herrn *Professor Dr. Hubert Kolb* und insbesondere Herrn *Privatdozent Dr. Volker Burkart* am Deutschen Diabetes Zentrum an der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf, die mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und für ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben.

„Die Analyse des Einflusses von IL-18 auf die Insulitis und die Diabetesentwicklung spontan diabetischer NOD-Mäuse“ vorgelegt von Andreas Hausmann

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist eine Autoimmunerkrankung. Durch eine aggressive Infiltration Langerhans'scher Insel kommt es zur selektiven Zerstörung pankreatischer β -Zellen mit anschließender Diabetes Manifestation. Im Tiermodell der spontandiabetischen NOD (Non Obese Diabetes)-Maus ist die Expression des proinflammatorischen IL(Interleukin)-18 Gens frühzeitig im Krankheitsverlauf erhöht.

Diese Arbeit untersuchte die Wirkung der exogenen Applikation des proinflammatorischen Zytokins IL-18 auf den Krankheitsverlauf bei NOD Mäusen gegenüber kontroll-behandelten NOD-Mäusen und nicht diabetischen Balb/c-Mäusen. Die Arbeitshypothese eines beschleunigten Krankheitsverlaufs wurde widerlegt: IL-18 unterdrückte und verzögerte die klinische Manifestation des Diabetes der behandelten NOD-Mäuse gegenüber den kontroll-behandelten NOD-Mäusen. Histologisch zeigte sich eine deutlich schwächer ausgeprägte Insulitis. Das Infiltrationsmuster der benigneren, Th2 dominierten Periinsulitis, überwog bei den IL-18-behandelten, das der aggressiven, Th1 dominierten Intrainsulitis bei den kontroll-behandelten NOD-Mäusen. Die für die Erkrankung kausale T-Helferzell-Balance (Th1/Th2) wurde durch die IL-18 Gabe in Richtung vermehrter nicht autoaggressiver Th2 Zellen verlagert. Das Verhältnis des Th1 Zytokins IFN(Interferon) γ zu den Th2 Zytokinen IL-4 und IL-10 nahm unter Behandlung signifikant ab. Die endogene proinflammatorische IL-18 Expression nahm bei den kontroll-behandelten im Vergleich zu den IL-18 behandelten Tieren deutlich zu. Das ebenfalls proinflammatorische Zytokin IL-12 (sowie das Verhältnisses IL-12p40/IL-12p35) des angeborenen Immunsystems zeigte auch eine verminderte Expression unter Behandlung. Die induzierbare Synthese des zytotoxischen Stickstoffmonoxids iNOS ist ein Haupteffektor der β -Zell-Zerstörung. Sie wird bei der Th1 dominierten aggressiven Intrainsulitis vermehrt exprimiert und beschleunigt die Erkrankung. Bei den IL-18 behandelten Mäusen stieg sie im Gegensatz zu den kontroll-behandelten Tieren nicht an.

Exogen systemisch appliziertes IL-18, ein potentiell proinflammatorisches Zytokin, hemmt im Modell der spontandiabetischen NOD-Maus, über die Verlagerung der T-Helferzell Balance zu einer Dominanz der Th2 Zellen, den Autoimmunprozess, der ursächlich für die Entstehung des Typ 1 Diabetes ist. Neben den bisher beschriebenen proinflammatorischen, kann es somit auch antiinflammatorische Eigenschaften zeigen.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Andreas Hausmann
geb. am 1. Juni 1971
in Essen; ledig

Schulbildung

1977-1981 Dionysiuschule; Städtische katholische Grundschule in Essen
1981-1990 Gymnasium Borbeck; Städtisches Gymnasium für Jungen und Mädchen in Essen. Abschluss: Allgemeine Hochschulreife.

Zivildienst

1990-1991 15 monatiger Dienst im Mobilen sozialen Hilfsdienst (MSHD) bei der „Familien- und Krankenpflege e.V.“, Moorenstr.10 in Essen.

Studium

1991-1992 Studium der Wirtschaftswissenschaft an der Ruhr-Universität in Bochum.
1992-1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf.
1994 Ärztliche Vorprüfung im Herbst und endgültige Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes.
1995 Erste Ärztliche Prüfung und USMLE step1 (erstes amerikanisches Staatsexamen) im Herbst.
1998 Zweite Ärztliche Prüfung im Frühjahr und Wechsel des Studienortes für das Praktische Jahr an die Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München.
1998-1999 Praktisches Jahr an der LMU in München und an der University of Washington in Seattle/USA:
Innere Medizin: Abteilung für Kardiologie im Klinikum Innenstadt der LMU München.
Anästhesie: Klinikum Großhadern der LMU München
Chirurgie: Emergency Room und Burns/Plastics am Harborview Medical Center und General Surgery an der University of Washington in Seattle.
1998 USMLE step 2 (zweites amerikanisches Staatsexamen) im Sommer.
1999 Dritte Ärztliche Prüfung im Sommer.
2002 Drittes amerikanisches Staatsexamen (CSA) im Oktober

Beruf

- 2000-2001 Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik III am Klinikum Großhadern der LMU in München.
- seit 08/2001 Assistenzarzt der Medizinischen Klinik III am Klinikum Großhadern der LMU in München.
- seit 2004 Wissenschaftliche Tätigkeit in der Arbeitsgruppe „Hämatopoietische Stammzelltransplantation“ von Prof. Hans-Jochem Kolb.

München im März 2006