

Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Deutsches Diabetes-Zentrum
Arbeitsgruppe Immun-Pathologie und Immun-Toxikologie
Prof. Dr. med. Helga Gleichmann

**Differentielle Regulierung
Th1-typischer und Th2-typischer Zytokinprofile
durch multiple niedrige Dosen Streptozotocin
im Mikromilieu pankreatischer Inseln
von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Müller

Düsseldorf 2001

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Gerd Fischer

Prodekan: Prof. Dr. rer. nat. Hanns Weiss

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Helga Gleichmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2001

**Meinen Eltern, meiner Schwester, meiner Oma
und meiner Freundin Basia
in Liebe und Dankbarkeit**

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann, die es mir ermöglichte, die vorliegende Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Für die Bereitstellung des Themas, die freundliche und sehr gute Betreuung und ihr großes Interesse an dieser Dissertation bedanke ich mich ebenso, wie für die vielen Anregungen und Diskussionen ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität zu übernehmen.

Als klinischer Direktor des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes danke ich Herrn Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Abteilung in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. Ernst Gleichmann danke ich für seine stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfe besonders bei immunologischen Fragen in dieser Arbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt unserer Arbeitsgruppe, allen voran Frau Dr. Patricia Ohly für ihre hilfreichen Anregungen, Diskussionen und ihre Unterstützung bei praktischen Arbeiten und Frau Claudia Dohle, die mir bei vielen Untersuchungen in dieser Arbeit hilfreich zur Seite stand. Beide haben mich während der ganzen Zeit begleitet und mit Rat und Tat unterstützt. Außerdem möchte ich Frau Sabine Schulte im Walde danken, die ebenfalls an einigen Untersuchungen beteiligt war. Allen möchte ich für die nette und fruchtbare Arbeitsatmosphäre danken, die mir die Erstellung dieser Arbeit leicht gemacht hat.

Vor allem möchte ich mich aber ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre tatkräftige und liebevolle Unterstützung in erster Linie in menschlicher aber auch in finanzieller Hinsicht erst ermöglicht haben, diese Dissertation anzufertigen. Danke und ich liebe Euch.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Dr. Basia Hofmann danken, ohne die ich vielleicht nie mit einer Dissertation begonnen hätte und die mich während meiner Arbeit ständig unterstützt hat. Ich hab´ Dich lieb.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Das Th1/Th2-Konzept.....	1
1.1.1. Die Entwicklung des Konzeptes.....	1
1.1.2. Kreuzregulation der beiden Th-Subtypen bei der Immunantwort.....	3
1.1.3. Transkriptionelle Regulation der Th1/Th2- Immunreaktionen.....	3
1.1.4. Das Th1/Th2-Konzept bei Diabetes mellitus...	4
1.2. Zytokine.....	6
1.2.1. Th1-typische Zytokine.....	6
1.2.1.1. Interferon γ	6
1.2.1.2. Tumor Nekrose Faktor α	8
1.2.2. Th2-typische Zytokine.....	9
1.2.2.1. Interleukin-4.....	9
1.2.2.2. Interleukin-10.....	11
1.2.3. Th3-typische Zytokine.....	12
1.2.3.1. Transformierender Wachstums- faktor β 1.....	12
1.3. Streptozotocin.....	13
1.3.1. Struktur und Vorkommen.....	13
1.3.2. Hoch-Dosis-STZ Diabetes-Modell.....	14
1.3.3. Multiple-Niedrig-Dosis-STZ Diabetes-Modell....	15
1.3.4. Pathogenetische Mechanismen des STZ- induzierten Diabetes.....	15
1.3.5. Die Wirkung von STZ auf Mäuse mit unter- schiedlichem H-2 Haplotyp.....	16
1.3.6. Geschlechtsabhängige Entwicklung eines MLD-STZ-Diabetes.....	17

1.3.7.	Altersabhängige Entwicklung eines MLD-STZ-Diabetes.....	17
1.4.	Das NOD-Mausmodell.....	17
2.	Fragestellungen.....	20
3.	Material und Methoden.....	21
3.1.	Versuchstiere und Organe.....	21
3.1.1.	Mäuse.....	21
3.1.2.	Organentnahme.....	21
3.2.	Material.....	21
3.2.1.	Reagenzien.....	21
3.2.2.	Lösungen und Zellkultur-Medien.....	23
3.2.3.	Geräte.....	26
3.2.4.	Verbrauchsmaterial.....	27
3.3.	Methoden.....	29
3.3.1.	In-vivo-Behandlung der Mäuse.....	29
3.3.2.	Bestimmung der Blutglucosekonzentration.....	29
3.3.3.	Isolierung pankreatischer Inseln.....	29
3.3.4.	Entnahme von Milzen und Präparation von Einzelzellsuspensionen.....	30
3.3.5.	In-vitro-Behandlung pankreatischer Inseln und Milzzellsuspensionen mit verschiedenen Konzentrationen STZ.....	31
3.3.6.	Einzelzellsuspension aus pankreatischen Inseln.....	31
3.3.7.	Fixierung der Inselzellsuspension mit gepuffertem Formaldehyd.....	32
3.3.8.	Markierung der Inselzellsuspensionen mit monoklonalen Antikörpern.....	32
3.3.9.	Typisierung im Durchflußzytometer.....	33
3.3.10	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	33

3.3.11.	Isolierung der RNA aus pankreatischen Inseln und Milzsuspensionen.....	34
3.3.12.	Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	35
3.3.13.	Synthese komplementärer DNA (cDNA).....	36
3.3.14.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	37
3.3.15.	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte.....	38
3.3.16.	Quantitative Analyse der PCR-Produkte.....	39
3.3.17.	Statistische Analyse.....	39
4.	Ergebnisse.....	40
4.1.	Ex-vivo-Befunde.....	40
4.1.1.	Durchflußzytometrische Bestimmung der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α sowie der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 in pankreatischen Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts nach MLD-STZ-Behandlung verglichen mit Inseln un behandelter Kontroll-Mäuse.....	40
4.1.2.	RT-PCR-Bestimmung der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α , der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 sowie des Th3-typischen Zytokins TGF β 1 in pankreatischen Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts nach MLD-STZ-Behandlung verglichen mit Inseln un behandelter Kontroll-Mäuse.....	43
4.1.3.	Berechnung der spektrophotometrisch bestimmten Gesamt-RNA-Konzentration/ 1000 Inseln.....	51

4.1.4.	Analyse der Blutglucosekonzentration in männlichen und weiblichen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.....	52
4.2.	In-vitro-Befunde.....	53
4.2.1.	Durchflußzytometrische Bestimmung der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α sowie der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 in pankreatischen Inseln.....	53
4.2.2.	RT-PCR-Bestimmung der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α , der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 sowie des Th3-typischen Zytokins TGF β 1 in pankreatischen Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts nach Inkubation mit STZ verglichen mit Kontroll-Inseln.....	56
4.2.3.	Berechnung der spektrophotometrisch bestimmten Gesamt-RNA-Konzentration/ 1000 Inseln.....	65
5.	Diskussion.....	65
6.	Literaturverzeichnis.....	68
7.	Zusammenfassung.....	87
8.	Abkürzungen.....	88

1. Einleitung

1.1. Das Th1/Th2-Konzept

1.1.1. Die Entwicklung des Konzeptes

CD4⁺ T-Lymphozyten werden in zwei Subtypen von T-Helfer (Th)-Zellen eingeteilt: Th1 und Th2. Diese Th-Subtypen wurden 1986 anhand ihrer unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster im Mausmodell beschrieben (Mosmann und Coffman, 1989; Mosmann et al., 1986; Mosmann und Sad, 1996). Auf den Menschen übertragen, wurde dieses Konzept zuerst bei bestimmten Krankheiten beschrieben, wie viralen Infekten, Infektionen mit Helminthen und Allergien (Romagnani, 1994). Das Konzept besagt (Abb. 1), daß Th1-Lymphozyten Interleukin-2 (IL-2), Interferon (IFN) γ und Tumor Nekrose Faktor (TNF α) bilden, Th2-Lymphozyten bilden im Gegensatz dazu IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (Mosmann et al., 1991; Fiorentino et al., 1989). In Zellkulturen ist die Entstehung von Th1-Klonen normalerweise dominant über die der Th2-Klone, kurzzeitige Stimulation führt primär zur Aktivierung von Th1-Klonen (Gajewski et al., 1989a). Kultivierung der Klone mit anti-CD3, Mitogenen oder IL-4 führt nach Restimulation mit IL-4 zur Th2-Bildung, während Kultivierung mit IL-2 oder IFN γ und Restimulation mit IFN γ zur Th1-Bildung führt (Gajewski et al., 1989b). Ein weiterer Unterschied zwischen Th1- und Th2-Subtypen ist die unterschiedlich starke Expression der mRNA für die β -Kette des IFN γ Rezeptors (Pernis et al., 1995). Neben den ursprünglich durch Mosmann et al. (1986) beschriebenen Th1- und Th2-Subtypen wurde später der Th3-Subtyp definiert (Abb. 1), der in erster Linie den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) β bildet (Mac Donald, 1998; 1999). Das Th1/Th2-Konzept nach Mosmann et al. (1986) wird von anderen Arbeitsgruppen nur bei bestimmten Krankheitsbildern für zutreffend erachtet, da viele charakterisierte Th-Klone eine Mischung aus einem Th1-, Th2- bzw. Th3-typischen Zytokinmuster zeigen und die beschriebenen Th1-/Th2-Zytokinmuster eher extreme Differenzierungsstadien eigentlich fließender Übergänge zwischen den T-Zellsubpopulationen darstellen (Kelso, 1995).

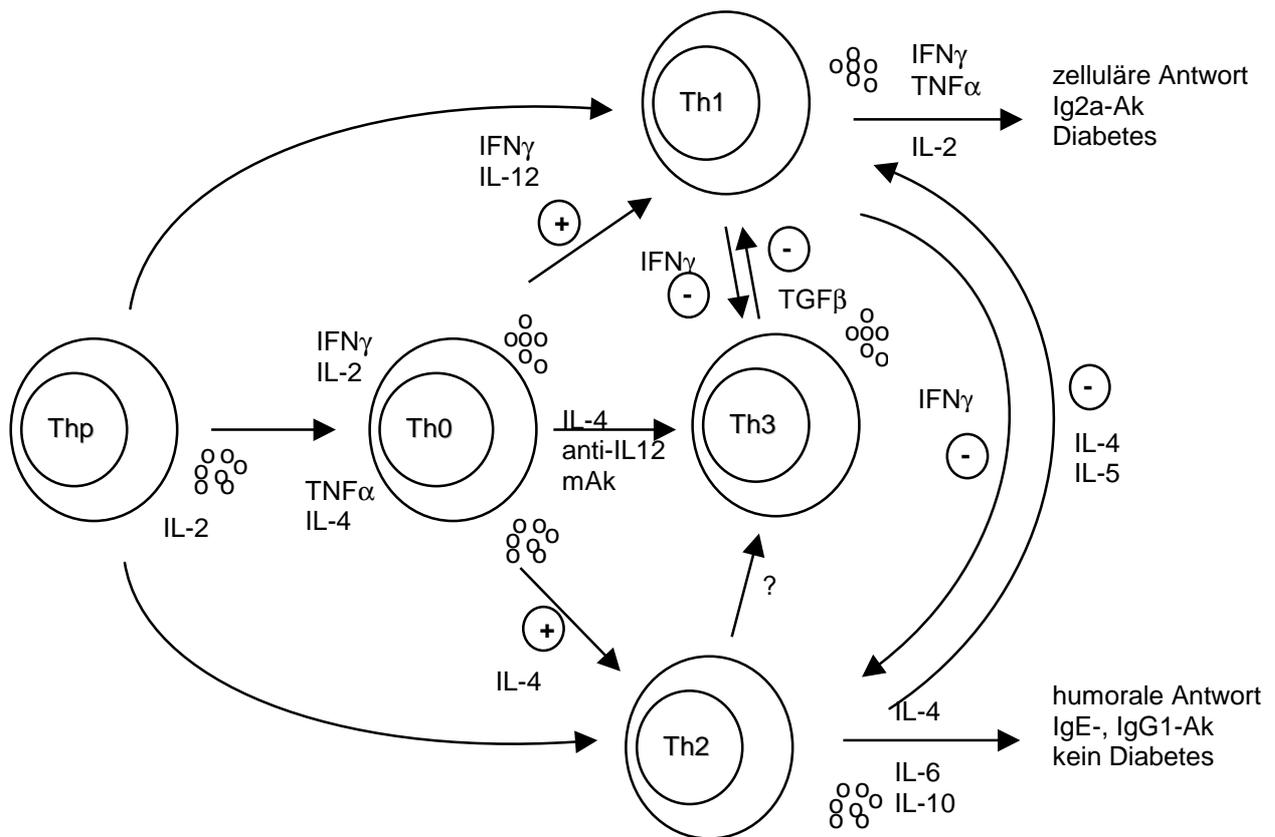


Abb. 1: Th1/Th2-Modell erweitert nach Mosmann et al., (1986). Ausschließlich IL-2-sezernierende Th-Vorläuferzellen (Thp) differenzieren sich zu Th0-Zellen, welche IL-2, IL-4, IFN γ und TNF α bilden können. Th0-typische Zellen differenzieren sich unter dem Einfluß von IL-12 und IFN γ in Th1-typische Zellen, unter dem Einfluß von IL-4 in Th2-typische Zellen und unter dem Einfluß von IL-4 und monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen IL-12 in Th3-typische Zellen. Die drei Th-Subtypen regulieren ihre eigene Proliferation durch selbst sezernierte Zytokine und inhibieren bzw. stimulieren die Proliferation der jeweiligen anderen Subtypen. Th1-typische Zellen sind beteiligt an der zellulären Immunität und am Isotyp-Klassenwechsel der B-Zellen zu Immunglobulin 2a (IgG2a). Th2-typische Zellen induzieren den Isotyp-Klassenwechsel zu IgG1/IgE und sind an der humoralen Immunantwort beteiligt. Von Th3-typischen Zellen ist bekannt, daß von ihnen gebildetes TGF β 1 inhibitorisch auf das Wachstum von Th1-Zellen wirkt.

1.1.2. Kreuzregulation der beiden Th-Subtypen bei der Immunantwort

Die Regulation der Differenzierung und der Aktivierung der T-Zellsubtypen geschieht durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) und Zytokine (Powrie und Coffman, 1993). Von Th1-typischen Klonen, CTL (zytotoxischen T-Lymphozyten) und NK-Zellen (Natürlichen Killerzellen) sezerniertes IFN γ inhibiert die Entwicklung von Th2-typischen Klonen (Gajewski und Fitch, 1988; Fernandez-Botran et al., 1988) und hebt viele Wirkungen des von Th2-typischen Zellen gebildeten IL-4 auf (Mosmann und Coffman, 1989). Im Gegensatz dazu wirkt das von Th2-typischen Zellen gebildete IL-10 inhibitorisch auf die Antigenpräsentation durch Makrophagen und die Proliferation der Th1-typischen Klone (Fiorentino et al., 1991).

1.1.3. Transkriptionelle Regulation der Th1/Th2-Immunreaktionen

Die Regulation einer sich entwickelnden Th-Antwort nach Antigenexposition wird einerseits gesteuert durch die Antigenstärke, die Signalstärke und durch kostimulatorische Moleküle, andererseits aber auch durch die Wirkung lokal gebildeter Zytokine, wie IL-12 oder IL-4 (O'Garra, 1998). Dabei aktiviert das von B-Zellen und Makrophagen gebildete IL-12 einen Transkriptionsfaktor Stat (Signal-Transducer und Activator der Transkription)4 und induziert eine Th1-typische Immunreaktion, während das von Th2-typischen Zellen und B-Zellen gebildete IL-4 Stat6 aktiviert und eine Th2-typische Immunreaktion einleitet (Wurster et al., 2000). Das Zinkfinger-Protein GATA3 ist dabei an der IL-4-abhängigen Aktivierung von Stat6 beteiligt und wird ausschließlich in Th2-typischen Zellen exprimiert, in Th1-typischen Zellen fehlt es. GATA3 inhibiert außerdem die IFN γ -Synthese der Th1-typischen Zellen, während es gleichzeitig die IL-4- und IL-5-Produktion der Th2-typischen Zellen steigert. An der transkriptionellen Regulation einer Th1-typischen Immunreaktion ist T-bet (T-box exprimiert in T-Zellen), ein Mitglied der T-box Proteinfamilie beteiligt. Die Expression von T-bet korreliert stark mit der IFN γ -Synthese und eine Th1-typische Immunreaktion wird durch T-bet induziert. T-bet inhibiert die Produktion von IL-4

und IL-5 in Th2-typischen Zellen und kann, wenn es in Th2-typische Klone transduziert wird, diese zur Synthese von IFN γ aktivieren (Rengarajan et al., 2000). Die Arbeitsgruppe von Glimcher et al. (2000) entwickelte kürzlich ein Modell der transkriptionellen Regulation der Th1/Th2-Immunreaktionen: Eine naive Thp-Zellen erhält Signale über den T-Zellrezeptor und kostimulatorische Moleküle. Dabei induziert lokal gebildetes IL-12 über die Aktivierung von Stat4 und T-bet eine Differenzierung in Richtung Th1-typische Zelle, während lokal gebildetes IL-4 Stat6 und GATA3 induzieren kann, was in einer Th2-typischen Reaktion resultiert. Faktoren, wie NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen), NF κ B (Nukleärer Faktor κ B) oder c-Maf (Proto-Onkogen) binden an bestimmte Sequenzabschnitte auf dem Gen für Zytokine und induzieren so die Zytokin-Produktion. Dabei ist NF κ B spezifisch für die Th2-typische Zytokinexpression, während c-Maf an der Th1-typischen Zytokinproduktion beteiligt ist. NFAT ist an der Regulation der Transkription der Zytokine beider Th-Subtypen beteiligt. Entscheidend für die Induktion des sich entwickelnden Th-Subtyps, also die Entwicklung einer proinflammatorischen Th1-typischen Immunreaktion oder einer anti-inflammatorischen Th2-typischen Immunantwort, ist das Gleichgewicht zwischen T-bet und GATA3 (Rengarajan et al., 2000).

1.1.4. Das Th1/Th2-Konzept bei Diabetes mellitus

Nach Rabinovitch und Suarez-Pinzon (1998) ist Diabetes das Ergebnis einer fehlerhaften Steuerung der Immunantwort. Pankreatische β -Zellen werden in genetisch sensiblen Individuen durch Autoimmunreaktionen, die gegen β -Zellantigene gerichtet sind, zerstört. Dabei werden pathogene Mechanismen durch Th1-typische Zellen vermittelt (Abb. 2). In diesem Modell werden den Th2-typischen Zytokinen IL-4 und IL-10 bzw. dem Th3-typischen Zytokin TGF β_1 protektive Effekte auf die Diabetespathogenese zugesprochen (Rabinovitch, 1993; 1994; 1998; Rabinovitch und Suarez-Pinzon, 1998).

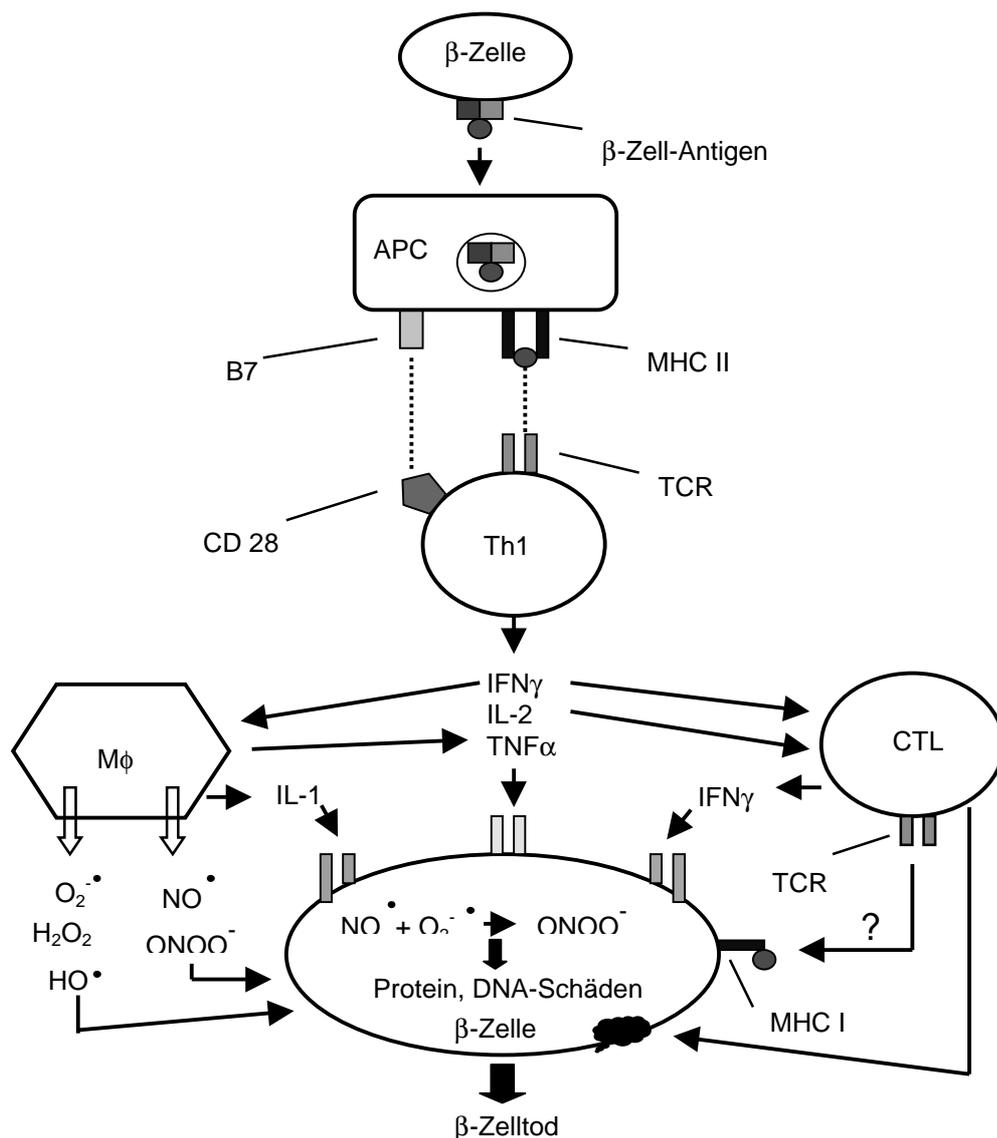


Abb. 2: Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese des Diabetes nach Rabinovitch, (1994). β -Zellproteine fungieren als Autoantigene (β -Ag), nachdem sie von Makrophagen ($M\phi$) oder anderen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zusammen mit MHC II-Molekülen präsentiert wurden. Der β -Ag-MHC II-Komplex, akzessorische Moleküle wie B7 und IL-12 vermitteln immunogene Signale, die in erster Linie Th1-Zellen aktivieren. Diese Th1-Zellen sezernieren IL-2 und $IFN\gamma$, welche die Produktion der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 inhibieren. Gleichzeitig werden durch IL-2 und $IFN\gamma$ zytotoxische T-Zellen (CTL) und Makrophagen aktiviert, welche β -Zellen über verschiedene unspezifische Mediatoren, wie freie Sauerstoffradikale ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot}), Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) und zytotoxisch wirkende Zytokine (IL-1, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$) zerstören können oder spezifisch durch direkte Bindung an einen β -Ag-MHC I Komplex auf der β -Zelloberfläche.

Aus Untersuchungen mit Non-Obese-Diabetic (NOD)-Mäusen, BioBreeding (BB)-Ratten und mit multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin (MLD-STZ)-behandelten Mäusen ist bekannt, daß eine Insulinitis und ein Diabetes mit einem Th1-typischen Zytokinprofil verbunden sind (Liblau et al., 1995; Katz et al., 1995; Almawi et al., 1999). In-vitro-Experimente, in denen Inseln verschiedener Mausstämme (C57BL/6, NOD u.a.) mit $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ und IL-1 behandelt wurden, zeigten, daß diese drei Zytokine einzeln und synergistisch zytotoxisch für pankreatische Inselzellen wirkten und die Insulinsekretion der β -Zellen hemmen konnten (Campbell et al., 1988).

Das in Maus- oder Ratten-Diabetesmodellen vorherrschende Th1-typische Zytokinprofil war im Blut diabetischer oder prädiabetischer Patienten nicht so eindeutig detektierbar. Stimulierte Lymphozyten aus Vollblut zeigten eine erhöhte $IFN\gamma$ -, $IFN\alpha$ - und $TNF\alpha$ -Produktion (Huang et al., 1995; Kallmann et al., 1997; Hussain et al., 1998), allerdings wurden auch $IFN\gamma$ - und IL-4-kosezernierende T-Zellklone aus dem Blut diabetischer Zwillinge isoliert (Wilson et al., 1997). Prädiabetische Patienten weisen geringere IL-4 und IL-10 mRNA-Expressionsraten und Proteinraten im Blut auf, ebenso wie eine verminderte IL-10 Produktion der Th2-Zellen (Berman et al., 1996; Szelachowska et al., 1998).

1.2. Zytokine

1.2.1. Th1-typische Zytokine

1.2.1.1. Interferon γ

a) Struktur und Funktion

$IFN\gamma$ ist biologisch aktiv als Homodimer von 20 – 25 kD und 143 Aminosäuren (AS) Länge. Ein 6 kb großes, 4 Exone enthaltendes Gen auf dem Chromosom 10 der Maus kodiert für das murine $IFN\gamma$.

Produziert wird $IFN\gamma$ von Th0-, Th1-, NK-Zellen und CTL. Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches in vitro und in vivo antivirale und antitumorizide

Wirkung zeigt und mononukleäre Phagozyten zur Phagozytose von tumor- oder virusinfizierten Zellen aktiviert. Außerdem erhöht $\text{IFN}\gamma$ die MHC-Klasse I- und II-Expression auf Zellen des Immunsystems und deren Zielzellen im Gewebe. In B-Zellen induziert $\text{IFN}\gamma$ den Isotyp-Klassenwechsel zu IgG2a und IgG3, während es zugleich das IL-4-abhängige B-Zellwachstum hemmen kann (Farrar und Schreiber, 1993; Pestka und Schreiber, 1987; Billiau, 1996). Von Th1-Zellen gebildetes $\text{IFN}\gamma$ wirkt antagonistisch auf die IL-4- und IL-10-Produktion der Th2-Zellen und deren Proliferation. Induziert wird die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion der Th1-Zellen durch das von Makrophagen und B-Zellen gebildete Zytokin IL-12 (Gajewski, 1989a; Paliard, 1988).

b) Die Beteiligung von $\text{IFN}\gamma$ an der Diabetespathogenese

Aus In-vitro-Experimenten geht hervor, daß $\text{IFN}\gamma$ alleine und synergistisch mit $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 zytotoxisch auf pankreatische β -Zellen wirkt. Dabei führen 200 U/ml $\text{TNF}\alpha$ und 200 U/ml $\text{IFN}\gamma$ zu einer Abnahme der Glucose-stimulierten Insulinfreisetzung und zu geringen morphologischen Veränderungen in den Zellen, während 2000 U/ml der jeweiligen Zytokine zur DNA-Fragmentierung und Inselzerstörung führen (Campbell et al., 1988; Pukel et al., 1988; von Herrath et al. 1997).

NOD-Mäuse, die $\text{IFN}\gamma$ transgen in den Inseln exprimierten (Ins- $\text{IFN}\gamma$) zeigten eine starke, proinflammatorische Immunantwort im Pankreas, die zur Induktion autoreaktiver T-Zellen führte, welche die Inseln infiltrierten (Sarvetnick et al., 1988; 1990; Pelegrin et al., 1998). Es existieren auch Untersuchungen in NOD-Mäusen, die überraschenderweise zeigen, daß die transgene Expression von $\text{IFN}\gamma$ in den Inseln durch Induktion regulatorischer Suppressor-T (Ts)-Zellen vor einem Diabetes schützen konnte (Falcone und Sarvetnick, 1999a; Gu et al., 1995). Eine prophylaktische Behandlung von männlichen und weiblichen NOD-Mäusen mit monoklonalen Antikörpern gegen $\text{IFN}\gamma$ konnte die Diabetesprogression aufhalten (Xiang et al., 1999; Nicoletti et al., 1996), da die β -Zellzerstörung abhängig von der $\text{IFN}\gamma$ -Expression in den Inseln ist (Hirai et al., 2000).

1.2.1.2. Tumor Nekrose Faktor α

a) Struktur und Funktion

TNF α ist ein physiologisch aktives Protein von 17 kD und 156 Aminosäuren Länge. Für TNF α kodiert ein 3,6 kb großes, 4 Exone enthaltendes Gen auf dem Chromosom 17 der Maus. Gebildet wird TNF α von Makrophagen, NK-, Mast-, Endothel- und Th1-Zellen. Seinen Namen bekam TNF α durch seine Wirkung auf Tumorzellen, wo TNF α zur Zytolyse und Zytostase führte. TNF α ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches die Phagozytose von Makrophagen und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen stimuliert. Außerdem ist TNF α an der Proliferation von B-Zellen und Th1-typischen Zellen beteiligt, wo es seine eigene Synthese autokatalytisch regulieren kann (Vassali, 1992).

b) Die Beteiligung von TNF α an der Diabetespathogenese

In den pankreatischen Inseln von NOD-Mäusen gebildetes TNF α stammt, wie immunhistochemische Untersuchungen in T- und B-zelldefizienten NOD.Scid-Mäusen zeigten, von Makrophagen und dendritischen Zellen (DC), welche zu einem frühen Zeitpunkt die Inseln infiltriert haben. TNF α initiiert lokale Entzündungsreaktionen und fördert somit die Infiltration inflammatorischer Th1-Zellen in das Pankreas (Dahlén et al., 1999). In vitro inhibiert TNF α in Konzentrationen von $> 1 \mu\text{g/ml}$ die Insulinfreisetzung der β -Zellen und potenziert die zytotoxische Wirkung von IFN γ und IL-1 β auf Inselzellen (Mandrup-Poulsen et al., 1987). Im Gegensatz dazu konnten tägliche subkutane TNF α -Injektionen in C57BL/6-Mäusen transplantierte Ratteninseln vor einem MLD-STZ-induzierten Diabetes und vor der Zerstörung durch reaktive Sauerstoff-Radikale schützen (Gerasmidi et al., 1993).

Die transgene TNF α -Expression in Inseln (Ins-TNF α) von NOD- und MLD-STZ-behandelten C57BL/6-Mäusen führte zu einer inflammatorischen lokalen Immunantwort und zu einer Insulitis, aber nicht zu einer Hyperglykämie (Picarella et al., 1993; Higuchi et al., 1992; Green und Flavell, 1999). In diesen Ins-TNF α -transgenen Mäusen wurden lokal Th1-typische Zytokinprofile induziert, die über

Wochen persistierten und zelluläre Infiltrationen induzierten, jedoch keine Hyperglykämie auslösten (Grewal et al., 1996; Green et al., 1998). Gegensätzliche Ergebnisse wurden berichtet über NOD-Mäuse, die systemisch mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt und mit syngeneten Inseln von diabetischen NOD-Spendern transplantiert wurden. So wurde einerseits mit $\text{TNF}\alpha$ die Zerstörung der Inseln verhindert durch Abnahme der infiltrierenden Zellen, vermutlich durch eine erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Produktion (Jacob et al., 1990; Rabinovitch et al., 1997). Andererseits wurde durch $\text{TNF}\alpha$ eine Progression einer benignen Peri-Insulitis in eine maligne Intra-Insulitis mit Diabetesfolge beobachtet (Pakala et al., 1999). Yang et al. (1994) hingegen fanden altersabhängige Effekte von injiziertem $\text{TNF}\alpha$ auf die Diabetesentwicklung in NOD-Mäusen. So wurde in bis zu 4 Wochen alten Mäusen die Diabetesentwicklung beschleunigt, während der Diabetes in ab 4 Wochen alten Mäusen verhindert wurde.

1.2.2. Th2-typische Zytokine

1.2.2.1. Interleukin 4

a) Struktur und Funktion

IL-4 ist als 20 kD Monomer mit 120 Aminosäuren Länge biologisch aktiv. Für das Protein kodiert ein 10 kb großes und 4 Exone enthaltendes Gen auf dem Chromosom 11 der Maus. Mast- und Th2-typische Zellen produzieren in erster Linie IL-4, welches die Steigerung der MHC II-Expression auf Effektorzellen des Immunsystems und den Isotyp-Klassenwechsel in B-Zellen zu IgE und IgG4 induziert. IL-4 wirkt anti-inflammatorisch, antagonisiert die Effekte des von Th1-typischen Zellen gebildeten $\text{IFN}\gamma$ und hemmt die Makrophagenaktivierung bei inflammatorischen Prozessen (Coffman et al., 1988; Sideras et al., 1988). Nach In-vitro-Stimulation kultivierter Th2-typischer Klone mit autokrin wirkendem IL-4, wurde das Wachstum und die Differenzierung kokultivierter Th1-Zellen gehemmt (Paliard et al., 1988; Fiorentino et al., 1989).

b) Die Beteiligung von IL-4 an der Protektion vor Diabetes

Klinische Studien zeigten, daß Patienten in der prädiabetischen Phase signifikant niedrigere IL-4 mRNA- und Protein-Expressionsraten im peripheren Blut hatten. Das Fehlen ausreichend hoher IL-4-Expressionsraten wird als Ursache für die fortschreitende Diabetesprogression diskutiert (Berman et al., 1996).

In Tiermodellen, wie der NOD-Maus, welche konstitutiv geringe IL-4-Expressionsraten in den Inseln aufweist, bewirkte eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-4 und IL-10 die Verschiebung von Diabetes zu einer Glucoseintoleranz (Calcinaro et al., 1997). Eine systemische Behandlung von NOD-Mäusen mit IL-4 (500 U/ml) dagegen hatte eine reduzierte Migration autoreaktiver T-Zellen in den Pankreas und eine Peri-Insulitis zur Folge (Cameron et al., 1997). Die IL-4-Produktion in NOD-Mäusen ist geschlechts- und zeitabhängig unterschiedlich, so zeigen männliche Mäuse im Alter von 1 - 2 Monaten eine erhöhte IL-4-Konzentration im Blut, während weibliche Mäuse eher eine erhöhte IFN γ -Konzentration aufweisen. Nach 8 - 12 Monaten sind diese geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht mehr nachweisbar (Fox und Danska, 1997).

Eine transgene Überexpression von IL-4 in den Inseln von NOD-Mäusen (Ins-IL-4) führte zu deutlich erhöhten IL-4- und IL-10-Expressionsraten. Diese Ins-IL4 transgenen Mäuse zeigten eine niedrigere Insulitisrate und waren dadurch vor einer Diabetesentwicklung geschützt. Eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-4 konnte die protektive Wirkung des IL-4 aufheben (Mueller et al., 1996; Gallichan et al., 1999).

Eine Vorbehandlung von jungen NOD-Mäusen mit IL-4, konnte transplantierte Inseln von diabetischen NOD-Spendermäusen vor der Zerstörung durch proinflammatorische Zytokine schützen, da lokal ein sich entwickelndes Th1-typisches Zytokinprofil supprimiert wurde (Rabinovitch et al., 1995). Auch die intraperitoneale (i.p.) Behandlung von weiblichen NOD-Mäusen mit IL-4 führte durch die gesteigerte Produktion protektiv wirkender Zytokine, wie IL-4, IL-10 oder IL-13 durch infiltrierende Th2-typische Zellen, zu einer Diabetesprotektion (Rapoport et al., 1993; Tominaga et al., 1998). Die Arbeitsgruppe von Nicoletti konnte zeigen, daß eine prophylaktische Behandlung von männlichen NOD-Mäusen mit IL-4 keine protektive Wirkung zeigte, da die behandelten Mäuse eine

vergleichbar hohe Insulitisrate wie unbehandelte Kontrollmäuse zeigten (Xiang et al., 1999).

In IL-4-defizienten (IL-4⁰) NOD-Mäusen blieb die Diabetespathogenese trotz der verminderten Produktion protektiver Zytokine wie IL-4 oder IL-10 unverändert, d.h. sie wurde nicht beschleunigt (Wang et al., 1998).

Im MLD-STZ-Diabetesmodell der Maus hingegen schützte die Vorbehandlung mit IL-4 männliche BALB/cBy-Mäuse vor einem STZ-induzierten Diabetes (Wood et al., 1999), während eine IL-4-Applikation in C57BL/KsJ-Mäusen keine protektive Wirkung zeigte (Herold et al., 1996).

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß sowohl die Behandlung mit IL-4 als auch eine IL-4-Überexpression vor Diabetes schützen kann, jedoch ist dieser Effekt nicht prinzipiell in allen Tiermodellen zu erzielen.

1.2.2.2. Interleukin 10

a) Struktur und Funktion

IL-10 ist biologisch aktiv als 18 kD Homodimer mit einer Länge von 160 Aminosäuren. Ein 4 Exone enthaltendes, 6 kb großes Gen auf Chromosom 1 der Maus kodiert für IL-10. Gebildet wird IL-10 von Makrophagen, Th2- und aktivierten B-Zellen und induziert den Isotyp-Klassenwechsel der B-Zellen zu IgG1 und IgG4. Als anti-inflammatorisches Zytokin hemmt IL-10 die Produktion proinflammatorischer Th1-typischer Zytokine wie IL-2 und IFN γ und wirkt direkt antagonistisch auf die Proliferation von Th1-Zellen (Fiorentino et al., 1991). Außerdem verringert IL-10 die Sauerstoffradikalbildung der Makrophagen bei zellvermittelten Immunreaktionen und reduziert die MHC II- und B7-Expression auf Zellen des Immunsystems (Moore et al., 1993; Mosmann, 1994).

b) Die Beteiligung von IL-10 an der Protektion vor Diabetes

Prädiabetische Patienten hatten im peripheren Blut eine deutlich geringere IL-4- und IL-10 mRNA-Expression und Protein-Produktion verglichen mit Kontrollprobanden (Szelachowska et al., 1998). Diskutiert wird eine Bedeutung für eine ausbleibende Kontrolle inflammatorischer Prozesse.

Im Tiermodell verhinderte die subkutane Vorbehandlung mit IL-10 in NOD-Mäusen die Entwicklung eines Diabetes. Es entwickelte sich nur eine benigne Peri-Insulitis, wobei IL-10 vermutlich direkt antagonistisch auf das von Th1-Zellen gebildete IFN γ wirkte (Pennline et al., 1994; Rabinovitch et al., 1995). Im Gegensatz dazu induzierten transplantierte, IL-10-produzierende Th2-typische Klone in NOD.Scid-Mäusen eine Hyperglykämie und Th2-vermittelte Nekrosen (Pakala et al., 1997). Im induzierten Diabetes-Modell mit MLD-STZ wiederum wurde in IL-10 transgenen BALB/c-Mäusen eine Hyperglykämie verhindert. Es wurde eine Insulitis mit in erster Linie IL-10-produzierenden Th2-typischen Zellen beobachtet, die vermutlich die Induktion inflammatorischer Reaktionen verhinderten (Wogensens et al., 1993; 1994; Moritani et al., 1994, Pauza et al., 1999). Im Gegensatz dazu blieb in IL-10-transgenen C57BL/6-Mäusen die Prävention eines MLD-STZ-induzierten Diabetes aus. Aber in IL-10-transgenen NOD-Mäusen wurde die Entwicklung des spontanen Diabetes verhindert. Eine Kreuzung zwischen NOD-Mäusen und IL-10-transgenen C57BL/6-Mäusen machte die F1-Hybriden jedoch wieder sensibler für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes (Lee et al., 1996; Balasa und Sarvetnick, 1996).

1.2.3. Th3-typische Zytokine

1.2.3.1. Transformierender Wachstumsfaktor β 1

a) Struktur und Funktion

TGF β 1 liegt biologisch aktiv als 14 kD Homodimer von 112 Aminosäuren Länge vor. Außer TGF β 1 existieren noch vier andere Isoformen, TGF β 2, TGF β 3, TGF β 4 und TGF β 5. Ein Gen mit 7 Exonen und ca. 100 kb Länge kodiert für TGF β 1, der von Th3-typischen Zellen, Makrophagen und Endothelzellen gebildet wird. TGF β 1 induziert die Synthese von Matrixproteinen auf Endothelzellen und den IgA bzw. IgG2a Isotyp-Klassenwechsel in B-Zellen. Als anti-inflammatorisches Zytokin hemmt TGF β 1 die Synthese von IFN γ , aber auch die IL-2-abhängige Proliferation der Th1-typischen Zellen, wobei es synergistisch mit dem von Th2-typischen

Zellen gebildeten IL-4 wirken kann. Außerdem unterdrückt TGF β 1 die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO \cdot) und reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), die von Makrophagen und Monozyten gebildet werden (Lawrence, 1996; Lafaille et al., 1998; Letterio und Roberts, 1998). Zusammen mit dem Antigen 4 zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLA-4) kann TGF β 1 inflammatorischen Autoimmunreaktionen entgegenwirken und Th0-, Th1- bzw. Th2-typischen Zellen können nach Kreuzvernetzung mit CTLA-4 ebenfalls TGF β 1 bilden (Prud'homme und Piccirillo, 2000).

b) Die Beteiligung von TGF β 1 an der Protektion vor Diabetes

TGF β 1-transgene NOD-Mäuse mit gezielter Expression in β -Zellen (Ins-TGF β 1) sind vor der spontanen Entwicklung eines Diabetes geschützt, da die im Alter von 3 Monaten infiltrierenden Th1-Zellen durch TGF β 1 unterdrückt werden können (King et al., 1998; Falcone und Sarvetnick, 1999). Ins-TGF β 1-transgene B6D2F1-Mäuse waren auch vor einem MLD-STZ-Diabetes geschützt, zeigten aber eine Insulitis und eine verminderte Insulinsekretion der β -Zellen. Doppelt transgene Ins-TNF α /Ins-TGF β 1 MLD-STZ-behandelte B6D2F1-Mäuse dagegen entwickelten eine schwere Insulitis und einen Diabetes (Sanvito et al., 1995).

1.3. Streptozotocin

1.3.1. Struktur und Vorkommen

Streptozotocin (STZ) ist ein natürlich vorkommendes, von *Streptomyces achromogenes* gebildetes Antibiotikum mit einem Molekulargewicht von 265 kD. Strukturell ist STZ aus einem Methyl-N-Nitrosoharnstoff-Anteil und einem D-Glucose-Anteil zusammengesetzt (siehe Abb. 3).

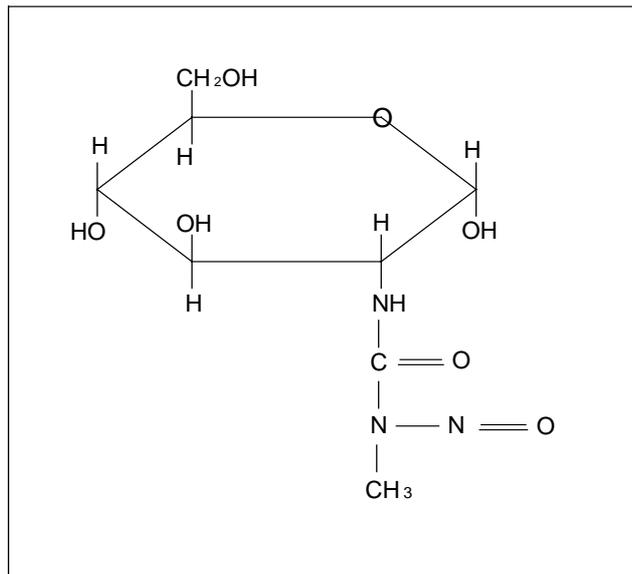


Abb. 3: Die Strukturformel von Streptozotocin (STZ)

Seine Verwendung sollte STZ in der Krebstherapie finden, zeigte jedoch in vorklinischen Studien mit Nagetieren eine diabetogene Wirkung (Bell et al., 1989). STZ zerstört relativ selektiv die β -Zellen in den pankreatischen Inseln, wobei der Glucoseanteil von STZ das Molekül über den Glucosetransporter 2 (GLUT2) als selektive Zielstruktur in die β -Zellen leitet (Wilson und Leiter, 1990; Wang und Gleichmann, 1998). Zur experimentellen Untersuchung des Diabetes in Ratten und Mäusen wurden 2 verschiedene Protokolle etabliert, bei denen unterschiedliche pathogene Mechanismen beteiligt sind.

1.3.2. Hoch-Dosis-STZ Diabetes-Modell

Eine einmalige i.p. Injektion einer hohen Dosis (HD) STZ (180 – 200 mg/kg KG) zeigte in Mäusen direkte β -zelltoxische Effekte mit ausgeprägter Nekrose nach 48 - 72 h und nachfolgender permanenter Hyperglykämie ohne vorhergehende Insulinitis (Rossini et al., 1977).

Multiple-Niedrig-Dosis-STZ Diabetes-Modell

Dieses Modell wurde erstmals von Like und Rossini (1976) in männlichen CD1-Mäusen etabliert. Durch mehrmalige i.p. Injektionen von niedrigen Dosen (MLD) STZ (40 mg/kg Körpergewicht (KG) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen) wurden zunächst subtoxische Effekte auf die β -Zellen und nachfolgend T-zellabhängige Immunreaktionen mit Infiltrationen der Inseln durch mononukleäre Zellen (Insulitis) induziert (Klinkhammer et al., 1988; Wilson und Leiter, 1990). Das MLD-STZ Diabetes-Modell ist aufgrund des autoimmunen pathogenen Mechanismus mehr mit dem menschlichen Typ-1-Diabetes vergleichbar als das HD-STZ Modell

1.3.3. Pathogenetische Mechanismen des STZ-induzierten Diabetes

STZ ist ein kurzlebiges, spontan zerfallendes Molekül, welches nicht metabolisiert wird und in eine Isocyanat-Komponente und ein Methylhydroxid zerfällt. Isocyanate können sowohl zelluläre als auch intramolekulare Komponenten carbamylieren. Das Methylhydroxid zerfällt weiter in ein hochreaktives Carboniumion, welches zur Alkylierung unterschiedlicher Zellkomponenten, wie DNA oder Proteine befähigt ist. An den für diese Alkylierungsreaktionen bevorzugten Positionen im DNA-Molekül, wie der N⁷- oder der O⁶-Position am DNA-Baustein Guanin, werden DNA-Läsionen hervorgerufen, die jedoch durch Reparaturmechanismen behoben werden können. Auch Alkylierungen von Schlüsselkomponenten der ATP-Synthase, wie glykolytische oder mitochondriale Enzyme, können zur letalen Zerstörung der Inseln führen (Wilson und Leiter, 1990). ROS wie H₂O₂ tragen zu einer DNA-Fragmentierung in Zellen pankreatischer Inseln bei. Diese Reaktionen wurden mit HD-STZ nachgewiesen, jedoch nicht mit MLD-STZ.

Im MLD-STZ Diabetes-Modell induziert STZ zwei unterschiedliche Effekte, eine direkte β -Zelltoxizität und T-zellabhängige Immunreaktionen. Dabei werden in vivo STZ-spezifische Th1-Lymphozyten aktiviert, die später in die Inseln wandern, wo sie an inflammatorischen Reaktionen beteiligt sind (Klinkhammer et al., 1988). Nur nach einer Kombination beider Effekte kommt es zur Entwicklung eines Diabetes.

Untersuchungen in empfänglichen CD1-Mäusen, die vor β -zelltoxischen Effekten und den Immunreaktionen geschützt wurden, konnten diese Wirkmechanismen belegen (Rossini et al., 1978a). Durch Vorbehandlung von CD1-Mäusen mit 3-O-Methyl-Glucose (3-O-MG) oder Nicotinamid unmittelbar vor jeder STZ-Injektion konnten die Mäuse vor der direkten Toxizität des STZ geschützt werden. Durch Behandlung mit Anti-Lymphozyten-Serum (ALS) konnten die inflammatorischen Immunreaktionen verringert werden und eine Hyperglykämie wurde verhindert. Nur durch gleichzeitige Behandlung mit ALS und 3-O-MG blieben die CD1-Mäuse euglykämisch und waren vor einem Diabetes geschützt (Rossini et al., 1978a). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß andere Mausstämmen, wie BALB/c- und C57BL/6-Mäuse durch Vorbehandlung mit dem Glucoseanalogon 5-Thio-D-Glucose sowohl vor einem HD- als auch einem MLD-STZ-Diabetes geschützt waren. Hier wurde die selektive β -Zelltoxizität des STZ verhindert, wobei die STZ-induzierte Insulinitis als Resultat inflammatorischer Reaktionen nicht beeinflusst wurde (Wang et al., 1993).

1.3.4. Die Wirkung von STZ auf Mäuse mit unterschiedlichem H-2 Haplotyp

Untersuchungen von Mausstämmen mit unterschiedlichem H-2 Haplotyp, die mit MLD-STZ behandelt wurden, zeigten, daß der H-2 Haplotyp die Diabetespathogenese mitbestimmen kann. So erwiesen sich C57BL/6-Mäuse mit dem Haplotyp H-2^b als relativ sensibel für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes, während BALB/c-Mäuse (H-2^d) relativ resistent waren (Leiter, 1985; Dayer-Métroz et al., 1988). Die F1-Generation einer Kreuzung der beiden Stämme [C57BL/KsJ x BALB/cByJ] entwickelte eine ähnlich ausgeprägte Hyperglykämie, wie der männliche Parentalstamm C57BL/KsJ (Herold et al., 1997). Es zeigten sich auch Unterschiede zwischen Mausstämmen, die den gleichen H-2 Haplotyp (H-2^d) exprimierten; so waren BALB/cJ-Mäuse deutlich resistenter gegen STZ als BALB/cByJ-Mäuse (Leiter et al., 1988). Auch kongene BALB/c-Mäuse mit gleichem H2-Haplotyp zeigten eine unterschiedliche Sensitivität für STZ (Wolf et al., 1984). Da Mausstämmen unterschiedlicher Zuchten, aber mit identischem H-2

Haplotyp sich als verschieden sensibel für die Toxizität des STZ erwiesen, müssen neben den Genen im Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) noch andere Nicht-MHC-gekoppelte Gene an der Sensitivität für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes beteiligt sein (Kiesel und Kolb, 1982; Weber et al., 1984).

1.3.5. Geschlechtsabhängige Entwicklung eines MLD-STZ-Diabetes

Im MLD-STZ Diabetes-Modell der Maus erwiesen sich männliche Mäuse empfänglicher für einen STZ-induzierten Diabetes als weibliche. Eine Kastration der weiblichen Mäuse, ebenso wie eine Behandlung mit Testosteron, erhöhte deren Sensitivität für einen MLD-STZ-Diabetes, während die Kastration bzw. Östrogen-Behandlung der Männchen deren Sensitivität erniedrigte (Rossini et al., 1978b; Le et al., 1985).

1.3.7. Altersabhängige Entwicklung eines MLD-STZ-Diabetes

In Experimenten mit Mäusen verschiedener Mausstämme, wie CD-1, C57BL/KsJ, DBA/2 und BALB/c, welche ein unterschiedliches Alter hatten (14 Tage, 45 Tage und 10 Monate), erwiesen sich die β -Zellen jüngerer Mäuse des jeweilig untersuchten Stammes als empfänglicher für die durch MLD-STZ-induzierte Toxizität und zeigten höhere Insulitisraten (Riley et al., 1981).

1.4. Das NOD-Mausmodell

Im Gegensatz zum MLD-STZ-Diabetes-Modell, in dem vorwiegend die männlichen Tiere einen Diabetes entwickelten, sind es bei den NOD-Mäusen in erster Linie die weiblichen Tiere, welche nach 4 - 6 Monaten zu 80 - 90% spontan eine Hyperglykämie haben. Nur 20 - 30% der männlichen NOD-Mäuse entwickeln einen Diabetes. Dem Diabetes geht innerhalb von 3 - 4 Wochen eine massive Insulitis mit mononukleären Zellen voran, gefolgt von einer β -Zelldestruktion durch

zytotoxische Immunzellen. NOD-Mäuse zeigen in den lymphoiden Organen (Milz, Thymus und Lymphknoten) konstitutiv einen hohen Anteil autoreaktiver T-Zellen, da die negative Selektion dieser T-Zellen im Thymus defekt ist. Dadurch fehlt ihnen die Toleranzentwicklung gegen Selbst-Antigene. Außerdem haben sie Immundefekte in der natürlichen und erworbenen Immunität (Leiter et al., 1999). So verändern CD4⁺ T-Zellen nach einer Stimulation mit Selbst-Antigenen innerhalb kurzer Zeit ihren Phänotyp von Th0/Th2 nach Th1, bilden vermehrt IFN γ und kaum IL-4/IL-10. Zudem ist bekannt, daß das Zytokinprofil zwischen den beiden Geschlechtern der NOD-Maus variiert, so zeigen weibliche NOD-Mäuse eine erhöhte Expression von IFN γ und TNF α , während die Männchen vermehrt IL-4 exprimieren. Dabei spielt IFN γ eine Rolle bei der β -Zelldestruktion, während insbesondere TNF α die Insulitisentwicklung beeinflusst (Hirai et al., 2000). In-vitro-Befunde zeigten, daß isolierte Inseln von NOD-Mäusen beiderlei Geschlechts keine signifikanten, geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Sensitivität für die Alkylierung durch STZ zeigen (Strandell und Sandler, 1997). Somit liegt als Ursache des Diabetes ein Defekt im Immunsystem mit Autoimmunität vor und nicht in Antigenen der β -Zelle.

Eine entscheidende Rolle bei der spontanen Entwicklung des autoimmunen Diabetes spielt zudem der H-2 Haplotyp der NOD-Mäuse, der H-2^{g7}. Aber auch nicht MHC-gebundene Gene sind an der Diabetespathogenese der NOD-Maus beteiligt (Serreze und Leiter, 1988; Delovitch und Singh, 1997; Leiter et al., 1999).

Die nachfolgende Tabelle faßt einige Untersuchungen im Diabetes-Modell der NOD-Maus und im MLD-STZ-Modell der Maus zusammen.

Tab. 1: Repräsentative Befunde mit Zytokinen und zum β -Zelltod im NOD-Mausmodell und im MLD-STZ Diabetes-Modell der Maus

Behandlung	NOD-Maus	MLD-STZ-Modell
	nach 1-2 Monaten: weibliche Mäuse exprimieren höhere Raten inflammatorischer Zytokine (IFN- γ , IL-2)	nach MLD-STZ: Anstieg IFN γ -produzierender T Zellen Induktion eines Th1-Zytokinprofils in Inseln

	männliche Mäuse exprimieren höhere Raten supprimierender Zytokine (IL-4, IL-10) (Delovitch and Singh, 1997; Leiter et al., 1999)	Athymische Nacktmäuse sind vor einem Diabetes geschützt (Buschard et al., 1978; Rossini et al., 1977; Paik et al., 1980)
orale Verabreichung von Insulin	Induktion der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 (Muir et al., 1995; Hancock et al., 1995; Ploix et al., 1998)	nicht untersucht
Transplantation von Th1-Zellen/ Klonen	massive Insulitis und Diabetes (Moritani et al., 1996; Healey et al., 1995)	nicht untersucht
Transplantation von Th2 Zellen/ Klonen	nur Peri-Insulitis, Schutz vor Diabetes (Healey et al., 1995)	nicht untersucht
Behandlung mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen IFN γ	Schutz vor Diabetes (Nicoletti et al., 1996)	Induktion eines Th1- nach Th2- Switches, Schutz vor Diabetes (Herold et al., 1996)
Behandlung mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen IL-4 and IL-10	schwere Insulitis und Diabetes (Calcinaro et al., 1997; Hammond et al., 1998)	keine Wirkung auf die Zytokin-Produktion (Herold et al., 1996)
Vorbehandlung mit IFN γ	schwere Insulitis und Diabetes (Rabinovitch et al., 1998; Leiter et al., 1989)	nicht untersucht
Vorbehandlung mit TNF α	Schutz in < 3 Wochen alten Mäusen; Insulitis und Diabetes in > 3 Wochen alten Mäusen (Jacob et al., 1990; Satoh et al., 1989)	nicht untersucht
Vorbehandlung mit IL-4	Schutz vor Diabetes (Cameron et al., 1997; Rabinovitch et al., 1995)	partieller Schutz vor Diabetes (Wood et al. 1999)
Vorbehandlung mit IL-10	Schutz vor Diabetes (Pennline et al., 1994; Rabinovitch et al., 1995; Moritani et al., 1996)	nicht untersucht
β -Zelltod	durch Apoptose (Suarez-Pinzon et al., 1999)	durch Apoptose, erstes Maximum an Tag 5 nach MLD-STZ (toxische Effekte); zweites Maximum an Tag 11 (immunogene Effekte) (O'Brien et al., 1996)

2. Fragestellungen

An der Pathogenese der β -Zelldestruktion im MLD-STZ-induzierten Diabetes-Modell der Maus sind T-zellspezifische Immunreaktionen und unspezifische inflammatorische Mediatoren wie reaktive Sauerstoff-Radikale sowie toxische Effekte durch STZ beteiligt. Im Diabetesmodell der NOD-Maus mit spontanem Diabetes wurde gezeigt, daß inflammatorische Th1-typische Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ an der Diabetes-Pathogenese beteiligt sind, während anti-inflammatorische Th2-typische Zytokine wie IL-4 und IL-10 und Th3-typische Zytokine wie $\text{TGF}\beta 1$ protektiv wirken können. Erste In-vivo-Untersuchungen einer Arbeitsgruppe zeigten, daß im MLD-STZ-Modell in pankreatischen Inseln von STZ-sensitiven Mausstämmen die Th1-Zytokine IL-2, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ hochreguliert wurden, während die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 reduziert wurden (Herold et al., 1996). In diesen Arbeiten fehlen jedoch Angaben zur Signifikanz der Zytokinexpressionen für den Diabetes, da die Befunde nur mit denjenigen in unbehandelten Kontrollmäusen verglichen wurden, jedoch keine Befunde für MLD-STZ-behandelte weibliche Mäusen erhoben wurden, welche keinen Diabetes entwickeln. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Analyse der Assoziation von STZ-induzierten Effekten auf Zytokinprofile in pankreatischen Inseln in vitro und ex vivo mit der Entwicklung eines Diabetes. Es wurden Untersuchungen zu folgenden Fragen durchgeführt:

- in vitro: a) Haben verschiedene Konzentrationen STZ einen Einfluß auf die Induktion eines Th1- oder Th2-typischen Zytokinprofils?
- b) Bestehen dosisabhängige Unterschiede in der Induktion eines Zytokinprofils nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen STZ?
- ex vivo: a) Besteht eine Korrelation zwischen der Ausprägung eines STZ-induzierten Zytokinprofils, dem Grad einer Insulitis und der Schwere der Hyperglykämie?
- b) Bestehen Unterschiede in den MLD-STZ-induzierten Zytokinprofilen zwischen männlichen und weiblichen Mäusen STZ-sensitiver und relativ resistenter Mausstämmen?

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere und Organe

3.1.1. Mäuse

Es wurden männliche und weibliche Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/6 und BALB/c im Alter von 5-6 Wochen von Harlan Winkelmann (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland) bezogen. Im Alter von 8-9 Wochen wurden die Mäuse für die In-vitro-Untersuchungen und im Alter von 7-8 Wochen für die In-vivo-Experimente eingesetzt. Alle Versuchstiere wurden unter konventionellen Bedingungen in Käfigen zu höchstens 5 Tieren gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Alle Tierversuche waren von der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen, genehmigt.

3.1.2. Organentnahme

Nach schmerzloser Tötung der Mäuse wurden die pankreatischen Inseln und Milzen entnommen und für molekularbiologische Untersuchungen bzw. durchflußzytometrische Analysen in vitro und ex vivo eingesetzt.

3.2. Material

3.2.1. Reagenzien

Substanz	Lieferant
Agarose	Roche (Mannheim)

Antikörper, monoklonale

IFN γ -FITC (Klon: XMG 1.2; Ratte IgG1)	PharMingen (Hamburg)
TNF α -PE (Klon MPGXT22; Ratte IgG1)	PharMingen (Hamburg)
IL-4-FITC (Klon BVD4-1D11; Ratte IgG2b)	PharMingen (Hamburg)
IL-10-FITC (Klon JE55-16E3; Ratte IgG2b)	PharMingen (Hamburg)
CD4-PE (Klon H129.19; Ratte IgG2a)	PharMingen (Hamburg)
CD8-PE (Klon 53-6.7; Ratte IgG2a)	PharMingen (Hamburg)
Ratte IgG1, κ -PE (Klon R3-34)	PharMingen (Hamburg)
Ratte IgG2a, κ -PE (Klon R35-95)	PharMingen (Hamburg)
Ratte IgG2b, κ -FITC (Klon A95-1) (Konzentrationen jeweils 0,1 mg/ml)	PharMingen (Hamburg)
Benzylpenicillin	Gibco (Eggenstein)
BSA: Bovine Serum Albumin	Sigma (Deisenhofen)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
DEPC: Diethylpyrocarbonat	Sigma (Deisenhofen)
D-Glucose	Sigma (Deisenhofen)
dNTP	Roche (Mannheim)
DTT: Dithiothreitol	Gibco (Eggenstein)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	ICN Biochemicals GmbH (Eschwege)
FBS: Fötales Rinderserum	Gibco (Eggenstein)
Ficoll Separating Solution	Biochrom KG (Berlin)
Hämolsreagenz (Digitonin)	Roche (Mannheim)
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution	Gibco (Eggenstein)
HCl: Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Hepes: N-(2-Hydroxyethyl)-	
Piperazin N'2 Ethan Sulfonsäure	Serva (Heidelberg)
Isopropylalkohol	Merck (Darmstadt)
Kollagenase Typ V	Sigma (Deisenhofen)
Mineralöl	ICN Biochemicals GmbH (Eschwege)
M-MLV Reverse Transkriptase	Gibco (Eggenstein)

Molekulargewichtsmarker	Roche (Mannheim)
NaCl: Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
NaHCO ₃ : Natriumhydrogenpyruvat	Merck (Darmstadt)
Oligo p(dT) ₁₂₋₁₈	Pharmacia (Freiburg)
Oligonucleotidprimer	MWG Biotech GmbH (Ebersberg)
PBS: Phosphat-gepufferte Lösung	Gibco (Eggenstein)
RNasin: Ribonukleaseinhibitor	Serva (Heidelberg)
RPMI 1640 Pulver	Gibco (Eggenstein)
STZ: Streptozotocin	Roche (Mannheim)
Taq Polymerase	Roche (Mannheim)
TRIS: Tris (Hydroxylmethyl) Aminomethan	Serva (Heidelberg)
TRIzol™ Reagenz	Gibco (Eggenstein)

Alle angegebenen Firmen sind in Deutschland vertreten.

3.2.2. Lösungen und Zellkultur-Medien

Agarose-Gel (1,5%) (Elektrophorese) ⁺	600 mg Agarose 40 ml TAE-Puffer [0,5 x] 1 µl Ethidiumbromid
DEPC-Wasser (0,1%) (PCR) ⁺	10 ml DEPC 1000 ml aqua bidest. über Nacht unter dem Abzug rühren, autoklavieren
FACS-Puffer	0,5 g/l Natriumazid [0,1%] 5 ml BSA [0,1%] 500 ml PBS

BFA-Fixanz (gepufferte Formaldehyd- Aceton-Lösung)	0,2 mg/ml Na ₂ HPO ₄ 1 mg/ml KH ₂ PO ₄ 45% (vol/vol) Aceton 9,25% (vol/vol) Formaldehyd 47,75% (vol/vol) aqua bidest.
Hämolyse-Lösung (Blutzuckermessung) ⁺	Digitonin 0,04 mmol/l Maleinimid > 1,0 mmol/l 1 Reagenztablette in 500 ml aqua bidest. lösen
HBSS-Medium * (Inselisolierung) ⁺	100 ml HBSS [10 x] 50 ml FCS [5%, inaktiviert] 2,4 g Hapes [10 mmol/l] ad 1000 ml aqua bidest. pH 7,2 – 7,4
Kollagenase-Lösung * (Pankreasdigestion) ⁺	2 mg Kollagenase V [2,3 U/mg] 1 ml HBSS
Krebs Ringer Bicarbonat HEPES-(KRBH)-Puffer (Inkubation der Inseln) ⁺	34,62 g/l NaCl 1,77 g/l KCl 1,86 g/l CaCl ₂ 0,77 g/l KH ₂ PO ₄ 1,47 MgSO ₄ 13,0 g/l NaHCO ₃ 10 mmol/l HEPES 2 mg/ml BSA
Natriumcitrat-Puffer (STZ-Lösungsmittel) *	4,5 g Tri-Natriumcitrat-5,5-Hydrat ad 500 ml aqua bidest = 25 mmol/l; pH 4,0

PBS-Puffer (Wasch- und Zentrifugationspuffer) ⁺	50 ml PBS [10 x] 450 ml aqua bidest.
RPMI 1640-Medium [*] (Inselkulturen) ⁺	10 g RPMI 1640 Pulver (+ L-Glutamin; - D-Glucose) 100 ml FBS [10%] 2 g NaHCO ₃ 1,01 g D-Glucose 20 ml Benzylpenicillin [100U/ml]/ Streptomycin [0,1 mg/ml] ad 1000 ml aqua bidest. pH 7,2 – 7,4
Saponin-Puffer (Waschpuffer) ⁺	5 g/l Saponin [0,5%] 90 mg/l Natriumazid [0,009%] 1000 ml PBS
STZ-Lösung (i.p. Injektion) ⁺	40 mg STZ 10 ml Natriumcitrat-Puffer
STZ-Lösung [*] (STZ-Behandlung in vitro) ⁺	2 mmol/l 10 mg STZ 1,5 ml Natriumcitratpuffer 4 mmol/l 20 mg STZ 1,5 ml Natriumcitratpuffer 6 mmol/l 30 mg STZ 1,5 ml Natriumcitratpuffer

50 x TAE-Puffer
(PCR) ⁺*Gebrauchslösung:*

0,04 mol/l Trisacetat

0,001 mol/l EDTA

Konzentrierte Stammlösung:

242 g Trisbase

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)

TE-Puffer
(PCR) ⁺

TrisCl [10 mmol/l] (pH 7,6)

EDTA [1 mmol/l] (pH 8,0)

+ = hauptsächlicher Verwendungszweck

* = Lösungen bzw. Zellkultur-Medien wurden mit Millipore-Filtern sterilfiltriert

3.2.3. Geräte**Gerät**

Autoklav

Begasungsbrutschrank

Blutzuckermeßgerät

Binokular Mikroskop

Computerprogramme

Densitometer

Durchflußzytometer (FACScalibur)

Elektronische Analysenwaage

Elektrophoresekammer

Lieferant

Melag (Berlin, Deutschland)

Heraeus Typ B5060 EK/CO₂

(Osterode, Deutschland)

Eppendorf EPOS Analyzer 5060

(Hamburg, Deutschland)

Wild M8 (Heerbrug, Schweiz)

Microsoft Word for Windows 98,

Power-Point, Graphpad Prism

Millipore (Ann Arbor, MI, USA)

Becton Dickinson

(Heidelberg, Deutschland)

Sartorius Typ 2024 MPG

(Göttingen, Deutschland)

Pharmacia Biotec

(Freiburg, Deutschland)

Elektrophorese-Stromversorger	Pharmacia Biotec (Freiburg, Deutschland)
Glashomogenisator (15ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Beckmann Typ GS-6KR (München, Deutschland)
Magnetrührer	Ikamag RH; IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Mikroprozessor pH-Meter	Knick-Klees (Düsseldorf, Deutschland)
Mörser mit Pistill	Haldenwanger (Berlin, Deutschland)
Photokamerasystem	Polaroid (Offenbach, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Schüttler	Laborbedarf Behr (Düsseldorf, Deutschland)
Spektrophotometer	Beckmann DU70; INV 3146 (München, Deutschland)
Sterile Werkbank	Heraeus Lamin Air Modell HLB 2472 (Osterode, Deutschland)
Thermocycler TRIO Thermoblock	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge A (Osterode, Deutschland)
UV-Transluminator	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)

3.2.4. Verbrauchsmaterial

<u>Material</u>	<u>Lieferant</u>
Combitips (2,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmal-Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml; steril)	Becton Dickinson, (Heidelberg, Deutschland)

Einmal-Pipettenspitzen (51 mm lang; 72 mm lang)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmal-Reagiergefäße (1,5 ml; 0,5 ml)	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Einmal-Spritzen (1 ml; 2ml; 5 ml; 10 ml)	Amefa (Kriftel, Deutschland)
Einmal-Spritzen Tuberkulin (1 ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Falcon-Zentrifugenröhrchen (15 ml; konisch; steril)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Falcon-Polystyren-Reagenzglas (für FACScan; 12 x 75 mm)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Falcon-Gewebekulturschalen (Petrischalen; 60 x 15 mm, 35 x 10 mm, 100 x 20 mm; steril)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Instant-Film Typ 665	Polaroid Corporation (Cambridge, MA, USA)
Kanülen (0,30 mm x 13 mm; 30 G x ½; steril 0,33 mm x 13 mm; 29 G x ½; steril 0,45 mm x 13 mm; 26 G x ½; steril)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Kristallpipettenspitzen	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Millex-GS Einwegfilter (0,22 µm Filtereinheit)	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Reagierröhrchen (14 ml; 105 x 16 mm)	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Sterivex-GS Filter (0,22 µm Filtereinheit)	Millipore (Eschborn, Deutschland)

3.3. Methoden

3.3.1. In-vivo-Behandlung der Mäuse

Es wurden Gruppen von jeweils 10 männlichen oder weiblichen C57BL/6- bzw. BALB/c-Mäusen entsprechend dem von Like und Rossini (1976) beschriebenen Protokoll mit MLD-STZ behandelt. Dabei erhielten die Mäuse an 5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine i.p. Injektion von 40 mg/kg KG. Das in Natriumcitrat gelöste STZ wurde innerhalb von 5 min nach Auflösung injiziert.

3.3.2. Bestimmung der Blutglucosekonzentration

Vor der Isolierung pankreatischer Inseln bzw. Entnahme der Milzen wurde den Versuchstieren 20 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer Einmal-Kapillarpipette entnommen. Die Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt nicht nüchtern. Die Glucosekonzentration wurde enzymatisch über die Reaktion der Hexokinase in einem EPOS 5060 Autoanalysator bestimmt.

3.3.3. Isolierung pankreatischer Inseln

Die Isolierung pankreatischer Inseln wurde nach der Methode von Gotoh et al. (1985) und der Modifikation von Zimny et al. (1993) durchgeführt. Nach Tötung durch cervikale Dislokation wurde die Bauchhöhle der Maus geöffnet und der Ductus choledochus zwischen Gallenblase und Duodenum vom umliegenden Gewebe freipräpariert. Die Mündungsstelle des Ductus in den Darm wurde mit einer Gefäßklemme abgeklemmt. Unter einem Binokular-Mikroskop wurden 2 ml einer frisch angesetzten, 4°C kalten Kollagenaselösung mit einer 2 ml Spritze und einer 20 G ½ Kanüle durch vorsichtige Injektion in den Ductus choledochus über den Ductus pancreaticus in das Pankreas geleitet. Das aufgeblähte Pankreas wurde vom umliegenden Gewebe freipräpariert, in eine Petrischale überführt und für 20-30 min bei 37°C und 5,5% CO₂ zur Digestion des exokrinen Gewebes

inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml 4°C kaltem HBSS-Medium wurde die enzymatische Aktivität der Kollagenase unterbrochen. Das angedaute Pankreasgewebe wurde anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und durch kurzzeitiges Schütteln mechanisch zerkleinert. Nach Zentrifugation bei 320 g für 10-15 sek in der Kühlzentrifuge bei 4°C wurde der Überstand mit dem exokrinen Gewebe verworfen und das Sediment mit den pankreatischen Inseln in 10 ml HBSS-Medium resuspendiert. Bei 320 g wurde wiederholt für 10-15 sek zentrifugiert, um weiteres exokrines Gewebe zu entfernen. Nachfolgend wurde das Sediment in 5 ml HBSS aufgenommen und die Gewebesuspension zu gleichen Volumina auf eine adäquate Anzahl Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Ficoll-Lymphozytentrennmedium aufgeschichtet. Die Röhrchen wurden ungebremst für 15 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Mit einer sterilen Pipette wurden die Inseln, die sich an der Trennschicht zwischen Ficoll und HBSS-Medium angereichert hatten, gesammelt und in eine HBSS-gefüllte Petrischale überführt. Die Inseln wurden mit der Hand durch zweimaliges Überpipettieren in eine HBSS-gefüllte Petrischale verlesen, um die Kontamination mit exokrinem Gewebe möglichst gering zu halten. Zur Kultivierung oder In-vitro-Behandlung mit STZ wurden die Inseln gezählt, in eine Petrischale mit 5 ml RPMI 1640-Kulturmedium überführt und bei 37°C und 5,5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.3.4. Entnahme von Milzen und Präparation von Einzelzellsuspensionen

Die Milzen wurden mit einer Pinzette freipräpariert, vom umliegenden Gewebe getrennt und in 10 ml 4°C kaltes HBSS gegeben. In einer Petrischale wurden die Milzen mit Hilfe eines Spritzenstempels mazeriert und die Zellsuspension bei 380 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Milzsuspension in 1 ml HBSS aufgenommen. Zur Separierung der Einzelzellen wurden 1,25 mg Trypsin in 0,5 ml HBSS gelöst und 50 µl dieser Lösung in das Reagiergefäß gegeben, welches unter mehrmaligen Schütteln bei 37°C und 5,5% CO₂ für 6 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die Suspension mit Hilfe einer 2 ml Spritze und einer Kanüle von 0,33 mm Durchmesser aufgenommen, die Milzzellen vereinzelt und in ein zweites Reagiergefäß überführt. Nachfolgend

wurde die Zellsuspension bei 380 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit HBSS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Sediment bis zur RNA-Isolation bei -80°C eingefroren.

3.3.5. In-vitro-Behandlung pankreatischer Inseln und Milzzellsuspensionen mit verschiedenen Konzentrationen STZ

In die benötigte Anzahl Petrischalen wurden 2 ml KRBH vorpipettiert und eine gleich große Anzahl Inseln bzw. ein gleich großes Volumen Milzzellsuspension auf die jeweiligen Petrischalen verteilt. Die benötigten Konzentrationen STZ (2, 4 oder 6 mmol/l) wurden in 1,5 ml Natriumcitrat-Puffer gelöst. Jeweils 100 µl jeder Lösung wurden in die Petrischalen mit den Inseln bzw. den Milzzellsuspensionen gegeben und diese für 30 min bei 37°C und 5,5% CO₂ inkubiert. Die Kontrollen erhielten nur Natriumcitrat-Puffer. Nach 30 min wurden die Reaktion durch Zugabe von KRBH im Überschuß beendet und die Inseln bzw. Milzzellsuspension wieder in RPMI 1640-Kulturmedium überführt, zentrifugiert und bei -80°C eingefroren.

3.3.6. Einzelzellsuspension aus pankreatischen Inseln

Für die durchflußzytometrischen Analysen der Zellen für ein bestimmtes Zytokin müssen aus den Inseln Einzelzellen isoliert werden, die später permeabilisiert und fixiert werden, damit die verwendeten monoklonalen Antikörper intrazellulär an ihre Epitope binden können. Deshalb wurden die Inseln mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und für 5 min in der Biofuge bei 380 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1,5 ml HBSS resuspendiert. Zur Trennung der Einzelzellen wurden 1,25 mg Trypsin in 0,5 ml HBSS gelöst und 50 µl dieser Lösung in das Reagiergefäß gegeben, welches unter mehrmaligen Schütteln bei 37°C und 5,5% CO₂ für 6 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die Inselzellsuspension mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle von 0,33 mm

Durchmesser aufgenommen, die Zellen vereinzelt und in ein zweites Reagiergefäß überführt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension bei 380 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit HBSS gewaschen.

3.3.7. Fixierung der Inselzellsuspension mit gepuffertem Formaldehyd

Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen die Inselzellsuspension resuspendiert und mit 200 µl BFA unter ständigem Schütteln auf einem Laborschüttler nach der Methode von Slaper-Kortenbach et al. (1988) fixiert. Diese Fixierungsmethode ist besonders geeignet zur durchflußzytometrischen Untersuchung intrazellulärer Antigene, da deren Epitope zugleich fixiert und die Zellmembran durchlässig gemacht wird. Nach 10 sek Fixierung wurden 1 ml 4°C kaltes HBSS auf die Zellen gegeben und diese bei 380 g und 4°C zweimal für 5 min in der Zentrifuge gewaschen. Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl mit einer Pipette abgenommen, die Zellsuspension resuspendiert und bis zur durchflußzytometrischen Analyse im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.3.8. Markierung der Inselzellsuspensionen mit monoklonalen Antikörpern

Die fixierte Inselzellsuspension wurde einmal mit Saponinpuffer gewaschen und bei 225 g und 4°C zentrifugiert. Hiernach wurde die Suspension auf die entsprechend für den Versuch benötigte Anzahl Polystyren-Röhrchen verteilt, die verschiedenen monoklonalen Antikörper in der Konzentration 1 µg/µl in FACS-Puffer verdünnt zugegeben und die Röhrchen für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 3 ml kaltes PBS zugegeben und bei 225 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, um die nicht gebundenen Antikörper von den Zellen zu waschen. Nach Entfernen des Überstandes wurde die Zellsuspension resuspendiert, erneut 3 ml HBSS zugegeben und die Zellen bei 225 g und 4°C für

5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen, das Zellsediment resuspendiert und im Durchflußzytometer analysiert.

3.3.9. Typisierung im Durchflußzytometer

Das FACScalibur ist ein Durchflußzytometer, bei dem das Licht eines Laserstrahls durch eine aufgenommene Zelle in der Meßkammer gleichmäßig in alle Richtungen gestreut wird. Der größte Teil des Lichtes wird in die Vorwärtsrichtung (forward scatter, FSC) gestreut und dies ist ein Maß für die Größe einer Zelle. Das Streulicht, welches im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut wird, in der Seitwärtsrichtung (side scatter) zeigt die Granularität der Zelle an. Eine Fluoreszenzmessung wird dadurch ermöglicht, daß der Argonlaser ein Licht in einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt, wodurch die Immunfluoreszenzfarbstoffe Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) angeregt werden und Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses emittierte Licht unterscheidet sich in den Wellenlängen: FITC emittiert im grünen und PE im roten Wellenlängenbereich. Mit Hilfe dieser Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich zwei weitere Parameter antikörper-markierter Zellen messen, die FITC-Markierung mit der Fluoreszenz 1 und die PE-Markierung mit der Fluoreszenz 2. Der Anteil der jeweiligen Markierung wird in Prozent Zytokin-positiver Zellen angegeben. Analysiert wurden jeweils 8.000-10.000 Zellen pro Versuchsansatz. Zellen, die mit nicht-markierten Antikörpern behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle.

3.3.10. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Analyse der mRNA-Expression wurde eine Methode entwickelt, die die reverse Transkription (RT) mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) verbindet. Hierbei wird die mRNA durch die reverse Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) übersetzt, die dann als Template für die nachfolgende PCR dient. Bei der von Mullis (1987) entwickelten Methode der PCR handelt es sich um eine enzymatische DNA-Vervielfältigungsmethode, bei der in vitro in mehreren

Schritten spezifische Primer (Oligonukleotide) entlang der Matrizen DNA verlängert werden, so daß Nukleotidstränge definierter Länge und Sequenz angereichert werden. Die Temperatur des Thermoblocks wechselt dabei periodisch, so daß die entstandenen DNA-Doppelstränge wieder denaturiert werden, die Primer sich erneut an die Einzelstränge anlagern und diese verlängern können. Bei dieser Methode wird die Hitzestabilität des Enzyms Taq-Polymerase, welches aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde, ausgenutzt, dessen Temperaturoptimum über 70°C liegt. Bei jedem Reaktionszyklus, bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Auffüllreaktion, kommt es zu einer Verdopplung der zu amplifizierenden DNA-Fragmente und damit zu einer exponentiellen, etwa 10^6 - 10^7 fachen Anreicherung dieser durch die Primer flankierten DNA-Fragmente (Mullis und Faloona, 1987).

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches sind die amplifizierten DNA-Fragmente als Banden vor dem Hintergrund der nicht amplifizierten DNA-Bereiche zu erkennen.

3.3.11. Isolierung der RNA aus pankreatischen Inseln und Milzsuspensionen

Als Gewebespender wurden für die In-vivo-Experimente 8-9 Wochen alte männliche und weibliche C57BL/6- und BALB/c-Mäuse in Gruppen von 10 Tieren verwendet, welche entweder mit MLD-STZ oder unbehandelt waren. Für die In-vitro-Experimente dienten 8-9 Wochen alte männliche und weibliche C57BL/6- und BALB/c-Mäuse in Gruppen von 10 Tieren als Gewebespender, deren Inseln und Milzzellsuspensionen in vitro mit verschiedenen Konzentrationen STZ (2, 4 und 6 mmol/l) behandelt wurden und bei -80°C eingefroren wurden.

Die Isolierung der RNA aus Inseln und Milzzellsuspensionen erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacci (1987). Die tiefgefrorenen Inseln und Milzzellen wurden aufgetaut und mit 1 ml TRIzol versetzt. TRIzol ist ein Gemisch aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, welches Gewebe homogenisiert, ohne die RNA zu zerstören. Durch 4-5 maliges Hin- und Herziehen einer 1 ml

Tuberkulinspritze mit einer 29 G1/2 Kanüle wurden die Inseln bzw. Milzzellen homogenisiert und Nucleo-Proteinkomplexe dissoziiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch nachfolgende Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4°C erfolgte die Trennung in eine organische Phenol-Chloroform-Phase am Röhrchenboden, eine weiße Interphase und eine farblose Oberphase. Diese wässrige Oberphase, in der die RNA angereichert war, wurde abgenommen und in ein zweites Reagiergefäß übertragen. Die proteinhaltige Interphase und die Phenol-Chloroform-Phase wurden verworfen. Durch Zugabe von 500 ml Isopropylalkohol wurde die RNA präzipitiert und für 10 min nach kräftigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4°C war das RNA-Präzipitat als gelförmiges Sediment sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das Sediment mit 1 ml 100%igem Ethanol versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde die Probe bei 7.500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, um überschüssige organische Anteile und Salze zu entfernen. Nach Zentrifugation mit 7.500 g bei 4°C für 5 min wurde der Überstand entfernt und das RNA-Sediment bei 56°C auf einem Thermoblock für 5-10 min getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Sediment in 10 µl (für die Inseln) bzw. 50 µl (für die Milzzellsuspension) Tris-EDTA-(TE)-Puffer aufgenommen und durch mehrmaliges Hin- und Herziehen mit einer Pipette gelöst.

3.3.12. Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten RNA wurde durch spektrophotometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Von der RNA-Suspension wurden 2 µl in 198 µl TE-Puffer verdünnt und die OD nach Kalibrierung des Photometers mit 200 µl TE-Puffer als Blindwert bestimmt. Der gemessene Wert bei 260 nm erlaubt die Berechnung der RNA-Konzentration in der Probe. Eine OD von 1 entspricht etwa 40 µg/ ml einzelsträngiger RNA. Das Verhältnis der gemessenen OD₂₆₀- zu OD₂₈₀-Werte läßt Rückschlüsse auf die

Reinheit der RNA zu, ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 ist dabei optimal. Nach Berechnung der Gesamtmenge isolierter RNA wurden Aliquots mit jeweils 1 µg RNA/ 4 µl DEPC-Wasser angesetzt und bei -80°C eingefroren.

3.3.13. Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Bei diesem als Reverse Transkription (RT) bezeichneten Prozeß, bei dem die reverse Transkriptase Desoxynukleosid-Triphosphate komplementär zum RNA-Strang synthetisiert, dient die isolierte RNA als Matrize für die Synthese eines doppelsträngigen DNA-Stranges. Die reverse Transkriptase benötigt als Startsequenz für die Synthese eines DNA-Stranges einen kurzen, doppelsträngigen Nukleinsäurebereich, der durch die Reaktion von Oligonukleotiden (Oligo dT) mit dem im RNA-Strang vorhandenen polyadenylierten Bereich (Poly A-Schwanz) entsteht.

Es wurden 1 µg Gesamt-RNA (1µgRNA/4µl DEPC-Wasser) mit 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (1µg/µl) und 5 µl DEPC-Wasser in einem Reagierröhrchen vermischt und für 5 min bei 60°C auf einem Thermocycler inkubiert. Nachfolgend wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus:

- 0,5 µl RNAsin (20U)
- 8,0 µl 5 x First-Strand-Reaktionspuffer
- 4,0 µl DTT (0,1 mol/l)
- 4,0 µl dNTP (10 mmol/l)
- 2,0 µl RTase (200 U/µl)

angesetzt und mit dem Reaktionsansatz aus RNA und Oligo (dT)₁₂₋₁₈ gemischt. Dieses Gemisch wurde bei 37°C für 1 h und bei 72°C für 10 min inkubiert. Ein Teil der synthetisierten cDNA wurde nachfolgend in der PCR zur Amplifizierung bestimmter DNA-Fragmente eingesetzt, während die restliche Menge bei -80°C eingefroren wurde.

3.3.14. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung bestimmter DNA-Fragmente der neu synthetisierten cDNA wurde die PCR nach der Methode von Watson und Demmer (1995) durchgeführt. In Tabelle 1 sind die verwendeten Zytokin-Primerpaare (Lai et al., 1997) angegeben sowie das Primerpaar für β -Actin, welches als Haushaltsgen diente (Alonso et al., 1986).

Tab. 2: Primer-Paare für die PCR der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β_1 und des Haushaltsgens β -Actin

mRNA	Primersequenz (5'-Primer/ 3'-Primer)	Produkt- länge (bp)	Hybridisierungs- temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
IFN γ	5'-TGAACGCTACACACTGCATCTTGG-3' 3'-GAGTCCTTCGCCTTTTCCTCAGC-5'	460	55	40
TNF α	5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGC-3' 3'-CTCAGGGCCCGTCCAGATGAAACC-5'	692	60	28
IL-4	5'-ATGGGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3' 3'-CTGAAGGACCTTTCGGATTTCTCG-5'	399	55	35
IL-10	5'-TCCTTAATGCAGGA CTTTAAGGGTTACTTG-3' 3'-CTGTGGAACCAGAA CCTCGAATAATTTTAG-5'	258	60	35
TGF β_1	5'-CTCCCACTCCCGTGGCTTCTAG-3' 3'-GTTCACACCTCGTTGTACACCTTG-5'	472	55	30
β -Actin	5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3' 3'-CTTTAGCACGCACTGTAGTTTCTC-5'	540	55	30

Zu dem Reaktionsgemisch bestehend aus:

- 23,5 µl DEPC-Wasser
- 5,0 µl 10 x Reaktionspuffer
- 3,0 µl MgCl₂ (25 mmol/l)
- 8,0 µl dNTP (1,25 mmol/l)
- 2,5 µl 5'-Primer (4 µM)
- 2,5 µl 3'-Primer (4 µM)
- 2,5 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)

wurden 5 µl der synthetisierten cDNA zugegeben. Nachfolgend wurden 50 µl Mineralöl auf das PCR-Gemisch aufgeschichtet, um die Verdunstung zu verhindern, und die Proben in den Thermocycler gegeben. Die DNA wurde für 5 min bei 94°C denaturiert; der anschließende Reaktionszyklus aus a) Denaturierung für 1 min bei 94°C, b) Primer-Anhybridisierung für 1 min bei einer für die jeweiligen Primer spezifischen Temperatur (siehe Tabelle 1) und c) Auffüllreaktion für 1 min bei 72°C wurde entsprechend der Primer-spezifischen Zyklenzahl wiederholt (siehe Tabelle 1). Abschließend wurde das PCR-Gemisch für 10 min bei 72°C inkubiert und dann gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.3.15. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Zur elektrophoretischen Trennung der amplifizierten PCR-Produkte wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel verwendet, welches mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde. Je 10 µl der PCR-Proben wurden mit 3 µl eines Auftragepuffers gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer war mit 100fach verdünntem TAE-Puffer gefüllt. Außerdem wurde 1 µl eines Molekulargewichtsmarkers (250 µg/ml), der den Bereich 154 - 2176 Basenpaare (bp) umfaßte mit 8 µl DEPC-Wasser verdünnt, mit 3 µl Auftragepuffer gemischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V und 50 mA für 30 – 40 min. Im UV-Transluminator wurden die entstandenen Banden sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera photographiert.

Quantitative Analyse der PCR-Produkte

Mit einem Omni-Media Scan-Densitometer wurden die Intensitäten der PCR-Produktbanden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und photographischer Dokumentation bestimmt. Das Verhältnis des Intensitätssignals des untersuchten Zytokin-PCR-Produkts zu dem des Haushaltsgens β -Actin wurde berechnet.

3.3.17. Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurden innerhalb jeder einzelnen Gruppe der Mittelwert (\bar{X}) sowie die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t -Testes bestimmt. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Ex-vivo-Befunde

4.1.1. Durchflußzytometrische Bestimmung der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α sowie der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 in pankreatischen Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts nach MLD-STZ-Behandlung verglichen mit Inseln unbehandelter Kontroll-Mäuse

Die Behandlung mit MLD-STZ führte in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 3; Abb. 4 A) zu einer signifikanten ($P \leq 0,05$) Steigerung der IFN γ - und TNF α -positiven Zellen am Tag 1 und am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion verglichen mit Inseln unbehandelter Kontroll-Mäuse. Vergleichbare Zunahmen der IFN γ - und TNF α -positiven Zellen waren auch in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse am Tag 1 und am Tag 3 zu beobachten verglichen mit Inseln unbehandelter Kontroll-Mäuse. Der Anstieg war in Inseln beiderlei Geschlechts am Tag 3 nach MLD-STZ am ausgeprägtesten. Im Gegensatz dazu, wurde die Anzahl positiver Zellen für IFN γ und TNF α in Inseln von BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts (Tab. 3; Abb. 4 B) signifikant ($P \leq 0.05$) durch MLD-STZ reduziert. Diese Reduktion war am Tag 3 nach der Behandlung mit MLD-STZ stärker ausgeprägt als am Tag 1. Die entsprechenden höheren Werte waren in Inseln von Kontroll-Mäusen von männlichen Spendern deutlicher ausgeprägt als in Inseln von weiblichen Mäusen. Die Behandlung mit MLD-STZ führte in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 3; Abb. 4 A) zu einer signifikanten ($P \leq 0.05$) Reduktion der positiven Zellen für IL-4 und IL-10 am Tag 1 und ebenfalls am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion, verglichen mit Inseln von Kontroll-Mäusen. Die Reduktion beider Th2-typischen Zytokine war am Tag 3 nach MLD-STZ-Behandlung am ausgeprägtesten. Im Gegensatz dazu zeigte MLD-STZ keine Veränderungen auf die Anzahl IL-4- und IL-10-positiver Zellen in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen. In Inseln von männlichen BALB/c-Mäusen (Tab. 3; Abb. 4 B) steigerte MLD-STZ die Anzahl IL-4- und IL-10-positiver Zellen am

Tag 1 und am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion verglichen mit Inseln un behandelter Kontroll-Mäuse. Diese Steigerung war noch deutlicher in Inseln weiblicher BALB/c-Mäuse sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 nach der letzten STZ-Injektion. Verglichen mit männlichen Kontrollmäusen waren die Werte in den weiblichen BALB/c-Kontrollen bereits konstitutiv höher. Die Anzahl IL-4- und IL-10-positiver Zellen war zu allen Untersuchungszeitpunkten in Inseln weiblicher BALB/c-Mäuse etwa doppelt so hoch wie in Inseln männlicher Spendermäuse.

Tab. 3: Ex-vivo-Analysen des Anteils positiver Zellen für IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-10 in Prozent ($X \pm SEM$) in Inseln un behandelter Kontrollen und am Tag 1 und 3 nach MLD-STZ

Mausstamm	Geschlecht	Zytokin	Kontrollen	Tag 1	Tag 3
C57BL/6	m	IFN γ	2,00 \pm 0,32	4,34 \pm 0,52*	8,76 \pm 0,82*
C57BL/6	w	IFN γ	3,22 \pm 0,59	3,29 \pm 0,68	8,74 \pm 0,27*
C57BL/6	m	TNF α	1,54 \pm 0,71	3,74 \pm 1,64	5,46 \pm 1,98*
C57BL/6	w	TNF α	2,34 \pm 0,81	2,43 \pm 0,76	5,14 \pm 2,01*
C57BL/6	m	IL-4	9,34 \pm 2,65	4,57 \pm 1,84*	1,98 \pm 0,58*
C57BL/6	w	IL-4	15,19 \pm 0,77	11,79 \pm 3,81	11,36 \pm 4,06
C57BL/6	m	IL-10	8,35 \pm 2,63	3,78 \pm 1,61*	1,89 \pm 0,73*
C57BL/6	w	IL-10	10,31 \pm 1,19	7,88 \pm 2,02	7,72 \pm 2,01
BALB/c	m	IFN γ	12,88 \pm 0,64	2,17 \pm 0,16*	1,51 \pm 0,66*
BALB/c	w	IFN γ	1,93 \pm 0,55	1,21 \pm 0,22	0,53 \pm 0,25*
BALB/c	m	TNF α	6,12 \pm 0,97	2,45 \pm 0,85*	1,51 \pm 0,66*
BALB/c	w	TNF α	2,04 \pm 0,22	1,61 \pm 0,38	0,73 \pm 0,25*
BALB/c	m	IL-4	3,95 \pm 0,37	8,29 \pm 0,67*	14,64 \pm 2,12*
BALB/c	w	IL-4	12,64 \pm 1,74	18,23 \pm 3,44*	29,39 \pm 8,69*
BALB/c	m	IL-10	7,47 \pm 0,88	11,88 \pm 1,04*	14,07 \pm 1,01*
BALB/c	w	IL-10	10,34 \pm 0,78	19,77 \pm 6,20*	27,87 \pm 6,63*

*P \leq 0,05 verglichen mit Kontrollen.

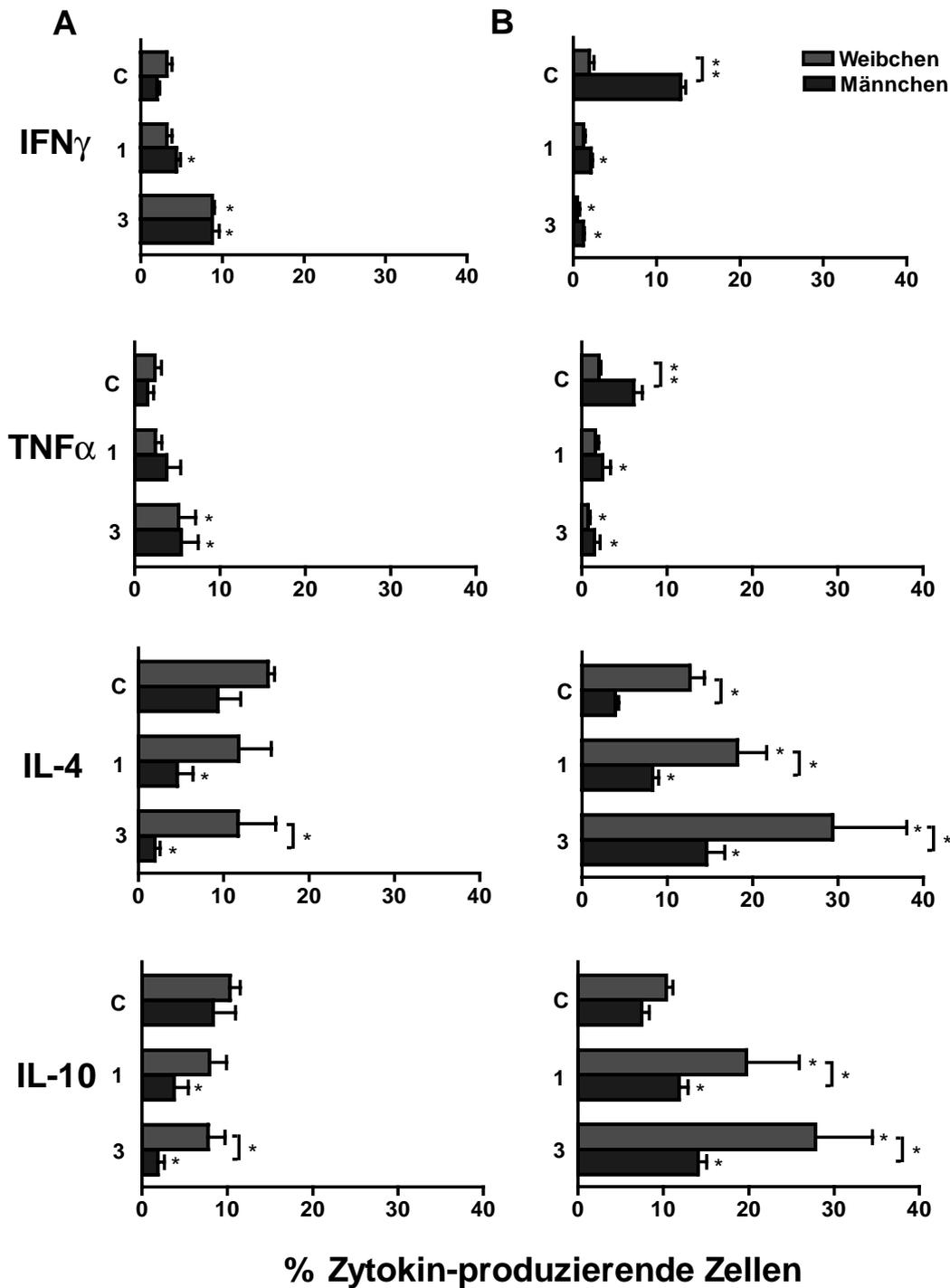


Abb. 4: Ex-vivo-Analysen des Anteils positiver Zellen für IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-10 in Prozent in Inseln von C57BL/6- (A) und BALB/c-Mäusen (B) beiderlei Geschlechts. Die Mäuse wurden mit MLD-STZ behandelt und die Inseln an Tag 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion isoliert. Inseln von unbehandelten Mäusen dienten als Kontrolle (C). Unmittelbar nach der Isolierung wurden aus den Inseln Zellsuspensionen hergestellt und Gruppen von 10^4 Zellen für durchflußzytometrische Analysen verwendet. Jedes Zytokin wurde aus dem gleichen Zellpool untersucht. * $P \leq 0,05$ vs unbehandelter Kontrolle, wenn nicht gesondert gekennzeichnet. Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

4.1.2. RT-PCR-Bestimmung der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α , der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 sowie des Th3-typischen Zytokins TGF β 1 in pankreatischen Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts nach MLD-STZ-Behandlung verglichen mit Inseln unbehandelter Kontroll-Mäuse

In Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 4; Abb. 5) konnte die mRNA der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α konstitutiv in Inseln unbehandelter Mäuse nicht nachgewiesen werden, wurde jedoch durch MLD-STZ signifikant ($P \leq 0,0005$) bereits am Tag 1 nach der fünften STZ-Injektion induziert mit einer weiteren Steigerung am Tag 3 nach Behandlung mit MLD-STZ. Auch in Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 4; Abb. 5) war die mRNA von IFN γ und TNF α konstitutiv nicht nachweisbar, wurde jedoch ebenfalls durch MLD-STZ signifikant ($P \leq 0,0005$) induziert und erreichte bereits am Tag 1 nach der fünften STZ-Injektion die maximale Expression.

Die Bestimmung der mRNA-Expression in Inseln von BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts zeigte ein ganz anderes Bild. IFN γ und TNF α wurden in Inseln männlicher und weiblicher Spender bereits konstitutiv sehr deutlich exprimiert. Die Spiegel waren in Substraten von männlichen Tieren 3-4 fach höher als von weiblichen Spendern (Tab. 4; Abb. 5). Anders als in den C57BL/6-Mäusen reduzierte die Behandlung mit MLD-STZ die mRNA-Expression beider Th1-Zytokine signifikant ($P \leq 0,0005$). Die Reduktion bestand in Inseln männlicher Mäuse bereits am Tag 1 nach der fünften STZ-Injektion und war am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion noch ausgeprägter. In Inseln weiblicher Spender entsprachen die Werte der mRNA der Th1-typischen Zytokine am Tag 1 nach MLD-STZ den Bestimmungen in der Kontrollgruppe und waren erst am Tag 3 nach MLD-STZ signifikant reduziert.

Im Gegensatz zu den Th1-typischen Zytokinen reduzierte die Behandlung mit MLD-STZ signifikant ($P \leq 0,0005$) die mRNA-Expression der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10, sofern konstitutiv meßbar, in Inseln von C57BL/6-Mäuse beiderlei Geschlechts (Tab. 4; Abb. 5). In Inseln männlicher Mäuse war IL-4 konstitutiv exprimiert, am Tag 1 nach MLD-STZ bereits deutlich reduziert und am

Tag 3 nach MLD-STZ nicht mehr nachweisbar. IL-10 war konstitutiv nicht exprimiert, am Tag 1 nach MLD-STZ nur schwach detektierbar und am Tag 3 nach MLD-STZ wiederum nicht mehr nachweisbar. In Inseln weiblicher Mäuse war IL-4 analog den männlichen Spendern konstitutiv exprimiert, am Tag 1 und am Tag 3 nach MLD-STZ reduziert, jedoch noch nachweisbar. IL-10 war konstitutiv exprimiert, am Tag 1 nach MLD-STZ schwach aber signifikant ($P \leq 0,05$) reduziert und am Tag 3 nach MLD-STZ deutlich und signifikant ($P \leq 0,0005$) reduziert. Die mRNA des Th3-Zytokins TGF β 1 war konstitutiv in Inseln unbehandelter männlicher und weiblicher Spender exprimiert und wurde durch MLD-STZ am Tag 1 nach der fünften STZ-Injektion vermindert. Am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion wurde die TGF β 1-mRNA-Expression weiter signifikant ($P \leq 0,0005$) in Inseln männlicher und weiblicher Spender reduziert. Die Ergebnisse in Inseln von BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts (Tab. 4; Abb. 5) waren gegensätzlich zu den Resultaten in Inseln von C57BL/6-Mäusen. Die konstitutiv geringen IL-4 mRNA-Expressionsspiegel in Inseln männlicher und weiblicher BALB/c-Mäuse konnten durch STZ signifikant ($P \leq 0,0005$) am Tag 1 und am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion gesteigert werden. Die deutlichste Steigerung erfolgte am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion. Das gleiche Expressionsmuster ergab sich für die IL-10 mRNA. In Inseln männlicher sowie weiblicher BALB/c-Spender war IL-10 konstitutiv gering exprimiert, wurde jedoch durch Behandlung mit STZ an den Tagen 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion signifikant ($P \leq 0,0005$) hochreguliert, wobei auch hier die größte Steigerung am Tag 3 beobachtet wurde. Auch das Th3-typische Zytokine TGF β 1 wurde in Inseln unbehandelter BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts niedrig exprimiert und konnte am Tag 1 und am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion signifikant ($P \leq 0,0005$) und deutlich gesteigert werden. Analog den Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 war die mRNA von TGF β 1 ebenfalls am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion am deutlichsten gesteigert. Repräsentative RT-PCR-Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 und TGF β 1 und β -Actin sind wiedergegeben in männlichen (Abb. 6) und weiblichen (Abb. 7) C57BL/6-Mäusen sowie in in männlichen (Abb. 8) und weiblichen (Abb. 9) BALB/c-Mäusen.

Tab. 4: Ex-vivo-mRNA-Expression von Zytokinen ($X \pm SEM$) in Inseln un behandelter Kontrollen und am Tag 1 und 3 nach MLD-STZ

Mausstamm m	Geschlecht	Zytokin	Kontrollen	Tag 1	Tag 3
C57BL/6	m	IFN γ	nd	0,083 \pm 0,004*	1,354 \pm 0,057*
C57BL/6	w	IFN γ	nd	0,903 \pm 0,042*	0,915 \pm 0,007*
C57BL/6	m	TNF α	nd	0,285 \pm 0,020*	1,654 \pm 0,092*
C57BL/6	w	TNF α	nd	0,500 \pm 0,020*	0,460 \pm 0,020*
C57BL/6	m	IL-4	0,161 \pm 0,003	0,005 \pm 0,001*	nd
C57BL/6	w	IL-4	0,206 \pm 0,001	0,052 \pm 0,003*	0,049 \pm 0,007*
C57BL/6	m	IL-10	nd	0,015 \pm 0,001*	nd
C57BL/6	w	IL-10	0,293 \pm 0,015	0,256 \pm 0,008 ⁺	0,009 \pm 0,002*
C57BL/6	w	TGF β 1	0,138 \pm 0,012	0,129 \pm 0,018	0,051 \pm 0,011*
C57BL/6	w	TGF β 1	1,299 \pm 0,054	0,631 \pm 0,011*	0,547 \pm 0,046*
BALB/c	m	IFN γ	0,919 \pm 0,013	0,547 \pm 0,010*	0,125 \pm 0,017*
BALB/c	w	IFN γ	0,226 \pm 0,022	0,224 \pm 0,024	0,010 \pm 0,001*
BALB/c	m	TNF α	0,932 \pm 0,017	0,179 \pm 0,008*	0,018 \pm 0,001*
BALB/c	w	TNF α	0,298 \pm 0,017	0,246 \pm 0,024	0,012 \pm 0,001*
BALB/c	m	IL-4	0,003 \pm 0,001	0,093 \pm 0,003*	1,714 \pm 0,018*
BALB/c	w	IL-4	0,097 \pm 0,009	0,097 \pm 0,011	0,514 \pm 0,021*
BALB/c	m	IL-10	0,010 \pm 0,001	0,127 \pm 0,002*	1,507 \pm 0,009*
BALB/c	w	IL-10	0,060 \pm 0,007	0,072 \pm 0,010	1,062 \pm 0,023*
BALB/c	m	TGF β 1	0,193 \pm 0,031	0,699 \pm 0,040*	2,196 \pm 0,087*
BALB/c	w	TGF β 1	0,032 \pm 0,002	0,819 \pm 0,044*	1,223 \pm 0,011*

*P \leq 0,0005, ⁺P \leq 0,05 verglichen mit Kontrollen; nd = nicht detektierbar.

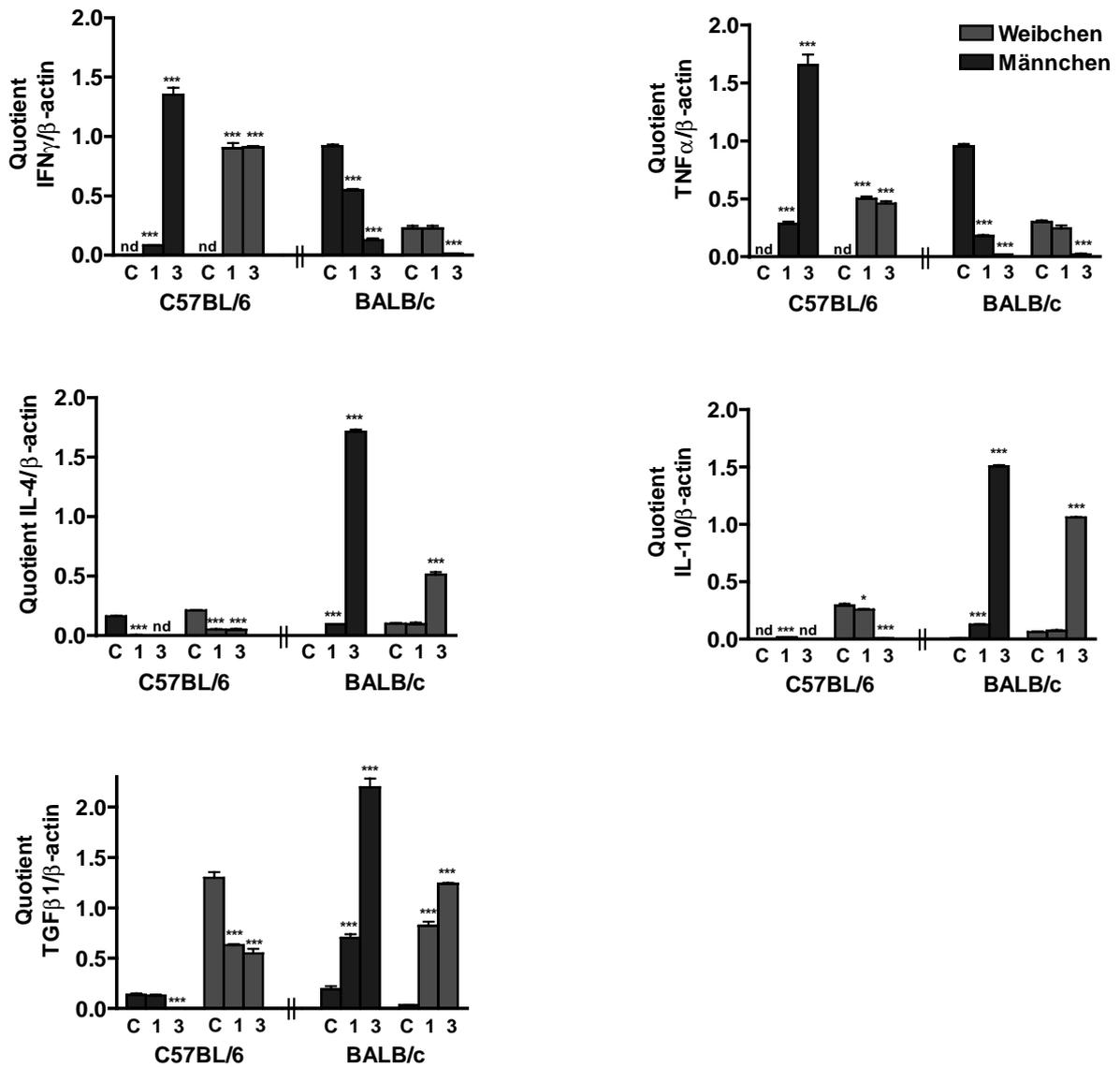


Abb. 5: Ex-vivo-RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 und TGF β 1 zu β -Actin in Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts. Die Mäuse wurden mit MLD-STZ behandelt und die Inseln an Tag 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion isoliert. Inseln von unbehandelten Mäusen dienten als Kontrolle (C). Jedes Zytokin und β -Actin wurde aus dem gleichen RNA-Pool untersucht. * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,0005$ vs unbehandelter Kontrolle. Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

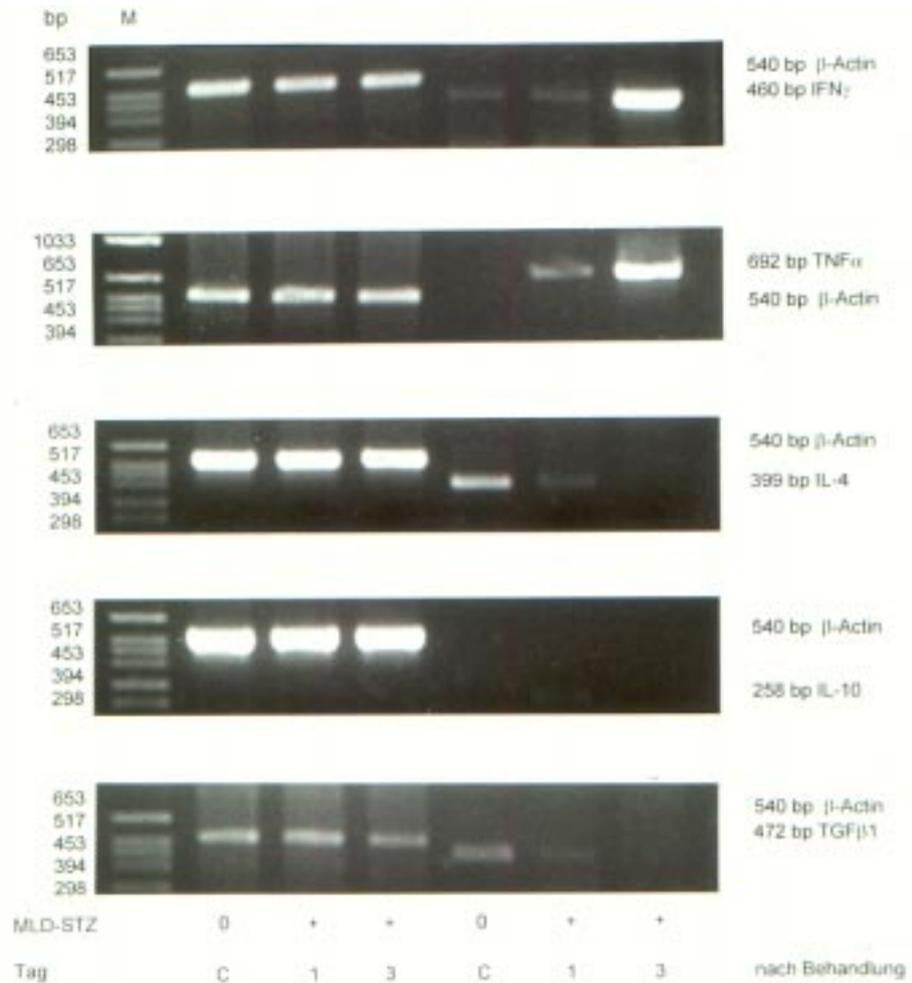


Abb. 6: Gelfotografien der Ex-vivo-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von männlichen C57BL/6-Mäusen. Die Mäuse wurden mit MLD-STZ behandelt und die Inseln an Tag 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion isoliert. Inseln von unbehandelten Mäusen dienten als Kontrolle (C). M: Marker; bp: Basen-Paare

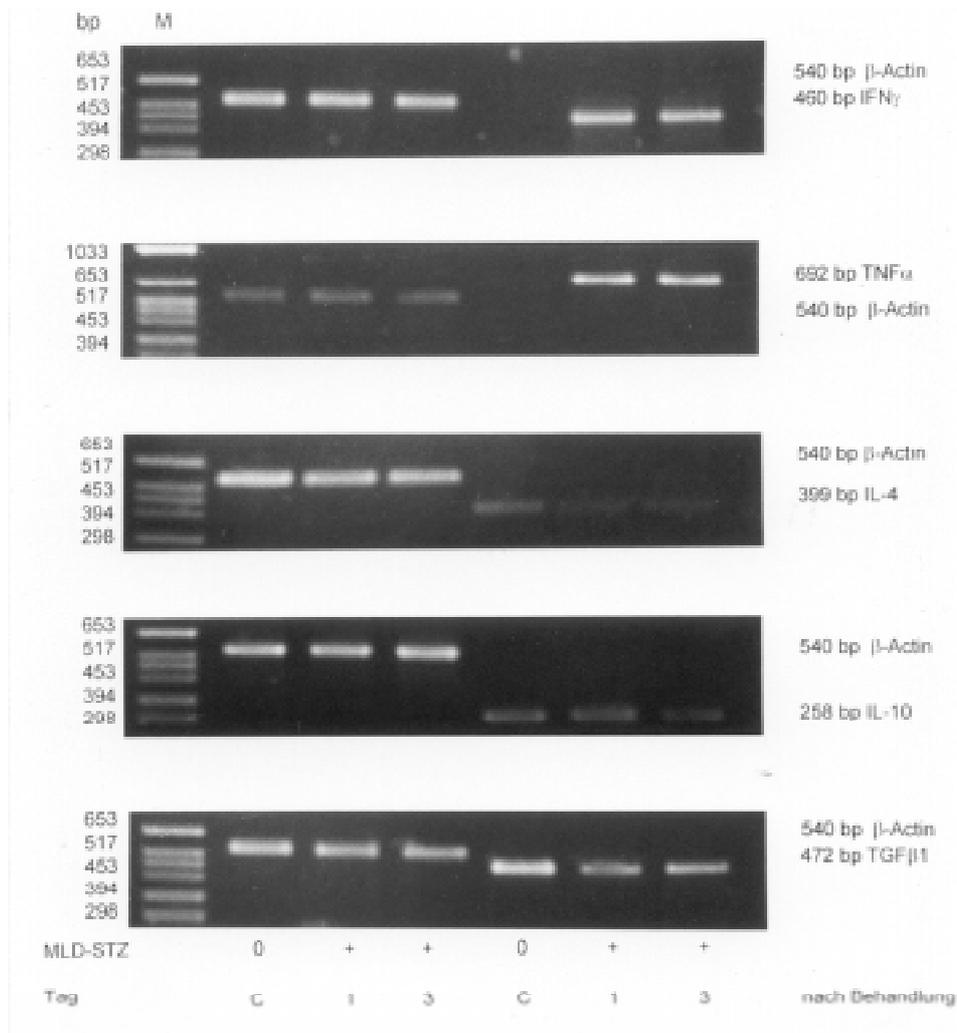


Abb. 7: Gelfotografien der Ex-vivo-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von weiblichen C57BL/6-Mäusen. Die Mäuse wurden mit MLD-STZ behandelt und die Inseln an Tag 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion isoliert. Inseln von unbehandelten Mäusen dienten als Kontrolle (C). M: Marker; bp: Basen-Paare

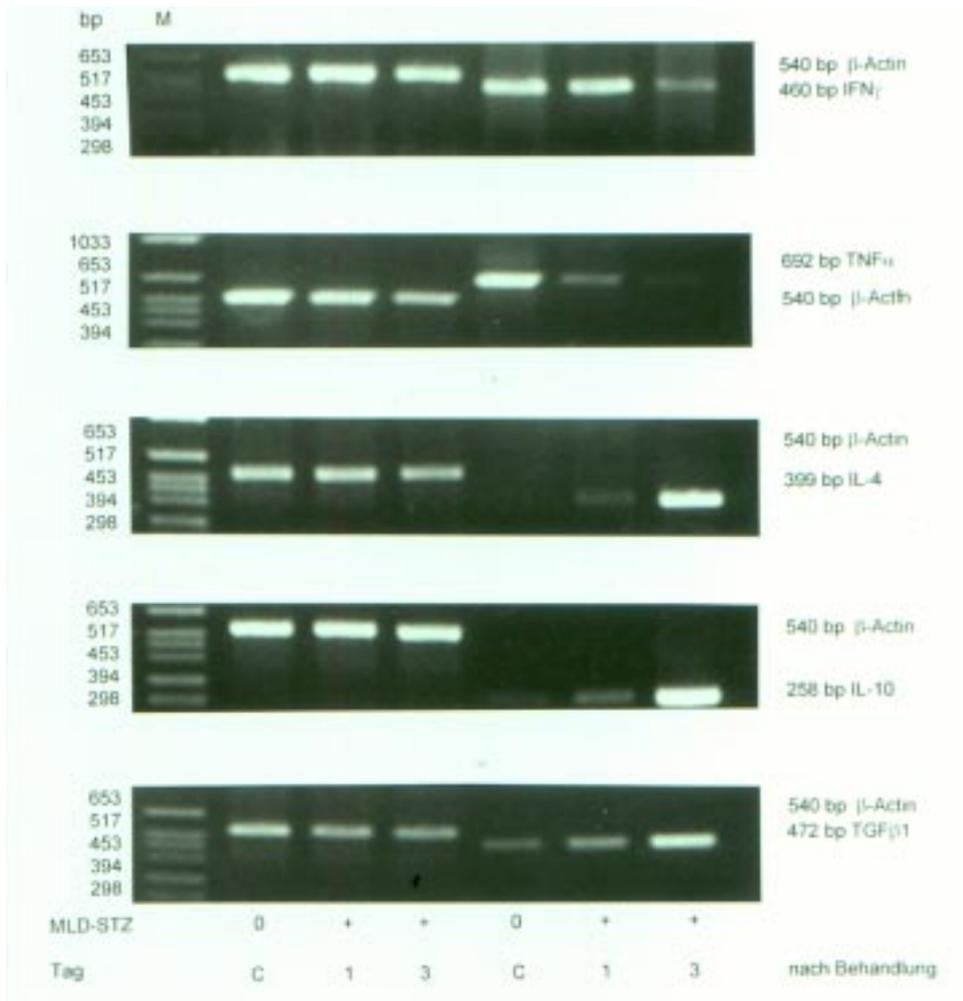


Abb. 8: Gelfotografien der Ex-vivo-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von männlichen BALB/c-Mäusen. Die Mäuse wurden mit MLD-STZ behandelt und die Inseln an Tag 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion isoliert. Inseln von unbehandelten Mäusen dienten als Kontrolle (C). M: Marker; bp: Basen-Paare



Abb. 9: Gelfotografien der Ex-vivo-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von weiblichen BALB/c-Mäusen. Die Mäuse wurden mit MLD-STZ behandelt und die Inseln an Tag 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion isoliert. Inseln von unbehandelten Mäusen dienten als Kontrolle (C). M: Marker; bp: Basen-Paare

4.1.3. Berechnung der spektrophotometrisch bestimmten Gesamt-RNA-Konzentration/ 1000 Inseln

In Tabelle 5 ist die Anzahl der isolierten Inseln am Tag 1 und Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts angegeben. Verglichen mit unbehandelten Kontroll-Mäusen induzierte MLD-STZ eine signifikante ($P \leq 0.05$) Reduktion. Mit dieser Reduktion ging jedoch keine signifikante Verringerung der Gesamt-RNA-Konzentration, berechnet auf 1000 Inseln, einher.

Tab. 5: Anzahl isolierter Inseln und errechnete Gesamt-RNA-Konzentration/ 1000 Inseln unbehandelter oder mit MLD-STZ-behandelter männlicher (m) und weiblicher (w) C57BL/6- und BALB/c-Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten

Mausstamm	Kontrolle		Tag 1		Tag 3	
	Anzahl Inseln	Gesamt RNA (μg)/ 1000 Inseln	Anzahl Inseln	Gesamt RNA (μg)/ 1000 Inseln	Anzahl Inseln	Gesamt RNA (μg)/ 1000 Inseln
C57BL/6 m	1385 \pm 31	17,84 \pm 0,21	954 \pm 9*	16,96 \pm 1,20	696 \pm 64*	18,18 \pm 0,41
C57BL/6 w	1267 \pm 56	18,06 \pm 0,13	906 \pm 83*	18,93 \pm 1,67	692 \pm 21*	17,52 \pm 0,57
BALB/c m	1013 \pm 41	18,01 \pm 0,67	500 \pm 45*	20,39 \pm 0,26	489 \pm 4*	19,56 \pm 0,11
BALB/c w	979 \pm 75	18,86 \pm 1,28	495 \pm 15*	20,76 \pm 0,92	395 \pm 25*	21,03 \pm 0,09

Nach der Isolierung der Langerhans-Inseln (s. 3.3.3.) wurde die Anzahl der Inseln ermittelt; die RNA der Inseln wurde isoliert (s. 3.3.11.) und spektrophotometrisch bestimmt (s. 3.3.12.); berechnet wurde die Gesamt RNA/ 1000 Inseln. * $P \leq 0,05$ verglichen mit Kontrollen.

4.1.4. Analyse der Blutglucosekonzentration in männlichen und weiblichen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Wie in Tabelle 6 dargestellt, war die Blutglucosekonzentration in männlichen C57BL/6-Mäusen am Tag 1 schwach und am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion signifikant ($P \leq 0.05$) erhöht gegenüber unbehandelten Kontroll-Mäusen. Weibliche C57BL/6-Mäuse zeigten dagegen am Tag 1 und am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion jeweils signifikante ($P \leq 0.05$) Erhöhung der Blutglucosekonzentration. In BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts war die Blutglucosekonzentration sowohl am Tag 1 als auch am Tag 3 nach der fünften STZ-Injektion signifikant ($P \leq 0.05$) erhöht gegenüber unbehandelten Kontroll-Mäusen, wobei die Erhöhung der Blutglucosekonzentration in männlichen Mäusen deutlicher war. Anzumerken ist, daß alle Erhöhungen deutlich unter dem Schwellenwert für Hyperglykämie lagen.

Tab. 6: Blutglucosekonzentration männlicher (m) und weiblicher (w) C57BL/6- und BALB/c-Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM in Gruppen von jeweils 20 Mäusen

Mausstamm	Blutglucosekonzentration (mmol/l)		
	Kontrolle	Tag 1	Tag 3
C57BL/6, m	7,30 \pm 0,13	7,89 \pm 0,25*	9,84 \pm 0,19*
C57BL/6, w	6,83 \pm 0,13	7,58 \pm 0,18*	7,73 \pm 0,16*
BALB/c, m	6,88 \pm 0,24	7,64 \pm 0,15*	7,84 \pm 0,11*
BALB/c, w	5,83 \pm 0,13	6,79 \pm 0,20*	7,26 \pm 0,19*

Die Bestimmung der Blutglucosekonzentration erfolgte wie unter 3.3.2. beschrieben. $P \leq 0,05$ verglichen mit Kontrollen.

4.2. In-vitro-Befunde

4.2.1. Durchflußzytometrische Bestimmung der Th1-typischen Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ sowie der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 in pankreatischen Inseln

Die Inkubation mit 2 mmol/l STZ führte in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 7; Abb. 10 A) zu einer leichten Steigerung des Anteils an $IFN\gamma$ - und $TNF\alpha$ -positiven Zellen verglichen mit Inseln, die mit dem Lösungsmittel von STZ behandelt wurden. In Inseln weiblicher C57BL/6-Mäuse zeigte sich eine vergleichbare Zunahme des Anteils an $IFN\gamma$ - und $TNF\alpha$ -positiven Zellen nach Behandlung mit 2 mmol/l STZ verglichen mit Lösungsmittel-behandelten Kontroll-Inseln.

Im Gegensatz dazu verringerte sich der Anteil positiver Zellen für $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ teilweise signifikant ($P \leq 0,05$) sowohl in Inseln männlicher als auch weiblicher BALB/c-Mäuse nach Behandlung mit 2 mmol/l STZ (Tab. 7; Abb. 10 B).

Die In-vitro-Behandlung mit 2 mmol/l STZ führte in Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 7; Abb. 10 A) zu einer leichten Reduktion des Anteils an IL-4-positiven Zellen verglichen mit Lösungsmittel-behandelten Kontroll-Inseln. Der Anteil positiver Zellen für IL-10 blieb in Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts nach Inkubation mit STZ unverändert.

Ein gegensätzliches Bild ergab der Anteil IL-4- und IL-10-positiver Zellen in Inseln von BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts (Tab. 7; Abb. 10 B). In Inseln männlicher BALB/c-Mäuse erhöhte sich die Anzahl IL-4- und IL-10-positiver Zellen signifikant ($P \leq 0,05$) nach Inkubation mit STZ. Der Anteil positiver Zellen für IL-4 und IL-10 war konstitutiv in Natrium-Citrat-behandelten Kontroll-Inseln weiblicher BALB/c-Mäuse signifikant ($P \leq 0,05$) höher verglichen mit Inseln männlicher Spender. Diese konstitutiv höhere Produktion beider Th2-typischen Zytokine konnte durch Inkubation mit STZ teilweise signifikant ($P \leq 0,05$) gesteigert werden.

Tab. 7: In-vitro-Analysen des Anteils positiver Zellen für IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-10 in Prozent ($X \pm SEM$) in Inseln unbehandelter Kontrollen und nach Behandlung mit 2mmol/l STZ

Mausstamm	Geschlecht	Zytokin	Kontrollen	2 mmol/l STZ
C57BL/6	m	IFN γ	3,57 \pm 2,35	7,89 \pm 4,98
C57BL/6	w	IFN γ	3,07 \pm 0,99	6,91 \pm 1,27
C57BL/6	m	TNF α	4,98 \pm 1,98	7,22 \pm 2,42
C57BL/6	w	TNF α	1,76 \pm 0,71	4,89 \pm 1,48
C57BL/6	m	IL-4	13,86 \pm 8,44	8,76 \pm 5,58
C57BL/6	w	IL-4	8,38 \pm 1,62	4,81 \pm 0,40
C57BL/6	m	IL-10	9,17 \pm 6,05	8,72 \pm 6,91
C57BL/6	w	IL-10	4,11 \pm 0,98	3,78 \pm 0,89
BALB/c	m	IFN γ	3,00 \pm 1,16	1,15 \pm 0,21*
BALB/c	w	IFN γ	6,19 \pm 1,81	4,55 \pm 1,49
BALB/c	m	TNF α	1,57 \pm 0,52	0,91 \pm 0,37*
BALB/c	w	TNF α	2,23 \pm 1,22	0,78 \pm 0,62*
BALB/c	m	IL-4	2,57 \pm 0,38	7,06 \pm 1,40
BALB/c	w	IL-4	13,28 \pm 4,16	21,50 \pm 4,90
BALB/c	m	IL-10	4,27 \pm 1,38	11,09 \pm 2,77*
BALB/c	w	IL-10	22,07 \pm 3,87	35,74 \pm 3,75*

*P \leq 0,05 verglichen mit Kontrollen.

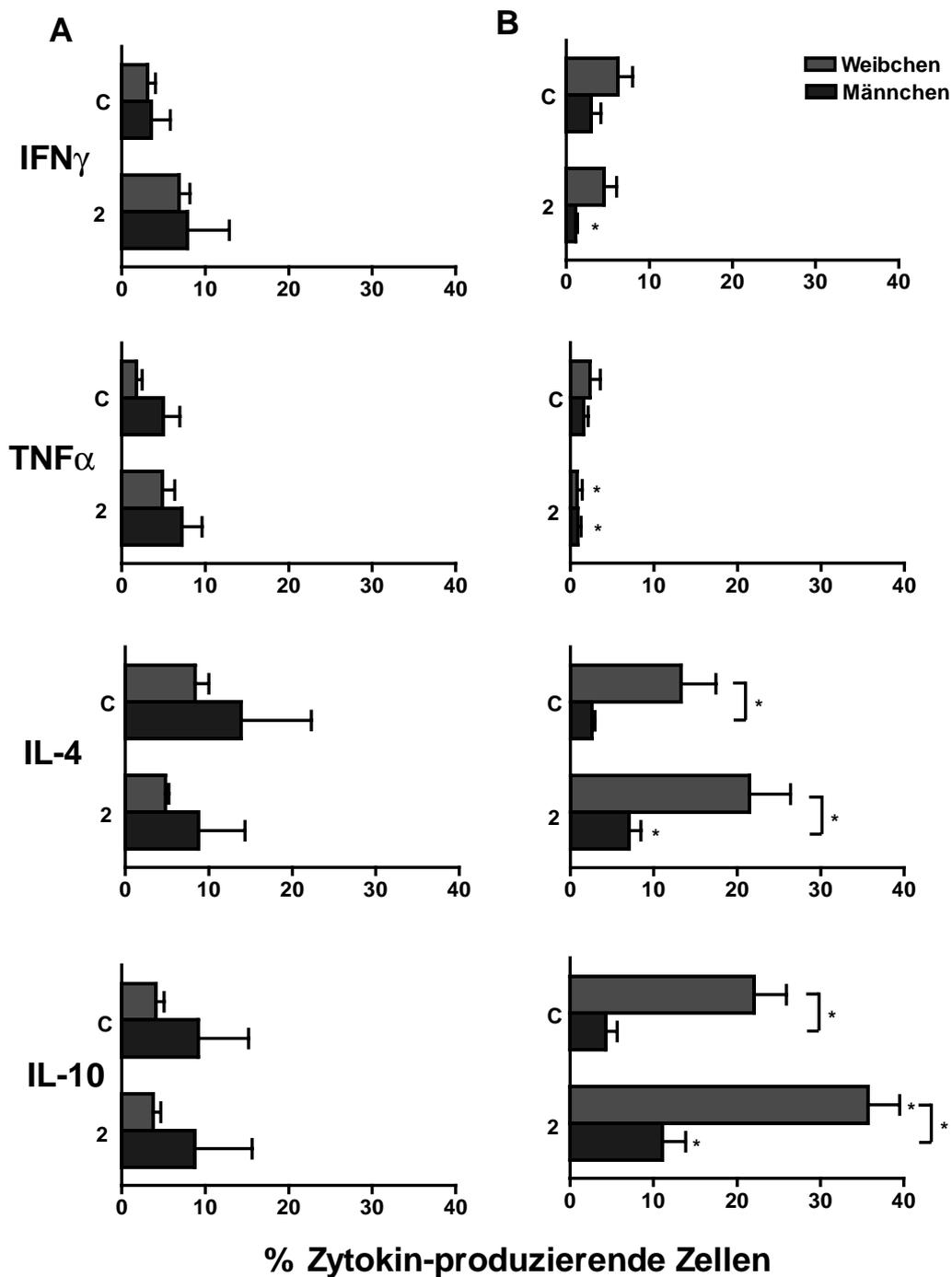


Abb. 10: In-vitro-Analysen des Anteils positiver Zellen für IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-10 in Prozent in Inseln von C57BL/6- (A) und BALB/c-Mäusen (B) beiderlei Geschlechts. Die isolierten Inseln wurden 30 min bei 37°C mit 2 mmol/l STZ inkubiert. Inseln, die mit dem Lösungsmittel von STZ behandelt wurden, dienten als Kontrollen (C). Nach der Inkubation mit STZ wurden Insel-Zellsuspensionen hergestellt und Gruppen von 10⁴ Zellen für durchflußzytometrische Analysen verwendet. Jedes Zytokin wurde aus dem gleichen Zellpool untersucht. * P \leq 0,05 vs unbehandelter Kontrolle, wenn nicht gesondert gekennzeichnet. Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

4.2.2. RT-PCR-Bestimmung der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α , der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 sowie des Th3-typischen Zytokins TGF β 1 in pankreatischen Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts nach Inkubation mit STZ verglichen Kontroll-Inseln

In vitro konnte die mRNA der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α in Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 8; Abb. 11) nicht detektiert werden und wurde erst durch Inkubation der Inseln mit 2 mmol/l STZ induziert, wobei die Induktion in Inseln männlicher Mäuse deutlicher war als in Inseln weiblicher Spender. Die Inkubation mit 4 mmol/l STZ reduzierte die IFN γ - und TNF α -mRNA-Expression sowohl in Inseln männlicher Mäuse als auch in Inseln weiblicher Spender. Die Behandlung mit 6 mmol/l STZ, der höchsten in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration, führte zu einer weiteren Reduktion der mRNA-Expression von IFN γ und TNF α in Inseln von Spendern beiderlei Geschlechts, wobei die Reduktion in Inseln weiblicher Mäuse stärker war.

Inseln männlicher und weiblicher BALB/c-Mäuse (Tab. 8; Abb. 11) zeigten nach Inkubation mit STZ ein anderes mRNA-Expressionsmuster als C57BL/6-Mäuse. Die mRNA von IFN γ und TNF α war konstitutiv in Inseln von BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts deutlich exprimiert, wobei die Expression von IFN γ in Inseln männlicher Mäuse deutlich höher war, während TNF α in Inseln beider Geschlechter vergleichbar stark exprimiert wurde. Nach Inkubation mit 2 mmol/l STZ verringerte sich die mRNA-Expression beider Th1-typischen Zytokine sowohl in Inseln männlicher als auch weiblicher Spender signifikant ($P \leq 0,0005$). Nach Zugabe von 4 mmol/l STZ wurde die mRNA von IFN γ und TNF α in Inseln männlicher und weiblicher Mäuse dosisabhängig reduziert, während die mRNA beider Zytokine nach Behandlung mit 6 mmol/l STZ in Inseln beider Geschlechter nicht mehr nachweisbar war.

Von den Th2-typischen Zytokinen zeigte IL-4 eine konstitutive mRNA-Expression in Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse (Tab. 8; Abb. 11), während IL-10 konstitutiv nur in Inseln weiblicher Spender exprimiert wurde. Nach Inkubation mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ war die mRNA beider Zytokine sowohl in Inseln männlicher als auch weiblicher Spender nicht mehr detektierbar. Die mRNA

des Th3-Zytokins TGF β 1 wurde konstitutiv in Citrat-behandelten Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts exprimiert und nach Inkubation mit STZ dosisabhängig und signifikant ($P \leq 0,0005$) reduziert. Bereits mit 2mmol/l STZ verringerte sich die Expression sowohl in Inseln männlicher als auch weiblicher Mäuse signifikant. Diese Reduktion war nach Inkubation mit 4 mmol/l STZ noch ausgeprägter. Nach Behandlung mit 6 mmol/l STZ war die TGF β 1-mRNA in beiden Geschlechtern nicht mehr detektierbar.

In BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts (Tab. 8; Abb. 11) wurde weder IL-4 noch IL-10 auf der mRNA-Ebene konstitutiv in Kontroll-Inseln exprimiert. Erst die Inkubation mit STZ induzierte signifikant ($P \leq 0,0005$) die mRNA-Expression beider Zytokine sowohl in Inseln männlicher Mäuse als auch weiblicher Spender. Diese Induktion war nach Inkubation mit 2 mmol/l STZ ausgeprägter als nach 4 und 6 mmol/l STZ. Verglichen mit 2 mmol/l verringerte die Inkubation mit 4 und 6 mmol/l STZ signifikant ($P \leq 0,0005$) die mRNA-Expression von IL-4 und IL-10 in Inseln beider Geschlechter. Auffällig ist, daß die mRNA von IL-10 nach STZ-Behandlung in Inseln männlicher Spender etwa doppelt so hoch exprimiert wurde verglichen mit Inseln weiblicher Mäuse. Die geringe mRNA-Expression von TGF β 1 in Citrat-behandelten Inseln weiblicher und männlicher BALB/c-Mäuse wurde durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen STZ dosisabhängig gesteigert, wobei 4 mmol/l STZ den größten Effekt zeigte. Diese Hochregulierung war nach Behandlung mit 2 und 4 mmol/l STZ signifikant gesteigert. Die Behandlung mit 6 mmol/l STZ bewirkte im Vergleich zu den Kontroll-Inseln keine signifikante Hochregulierung, jedoch, im Vergleich zu den hochregulierenden Effekten von 2 und 4 mmol/l STZ eine deutliche und signifikante ($P \leq 0,0005$) Reduktion. Repräsentative RT-PCR-Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 und TGF β 1 und β -Actin sind wiedergegeben in männlichen (Abb. 12) und weiblichen (Abb. 13) C57BL/6-Mäusen sowie in in männlichen (Abb. 14) und weiblichen (Abb. 15) BALB/c-Mäusen.

Tab. 8: In-vitro-mRNA-Expression von Zytokinen ($X \pm SEM$) in Inseln unbehandelter Kontrollen und nach Behandlung mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ

Mausstamm	G	Zytokin	Kontrollen	STZ Konzentration (mmol/l)		
				2	4	6
C57BL/6	m	IFN γ	nd	0,740 \pm 0,021*	0,380 \pm 0,014*	0,316 \pm 0,016*
C57BL/6	w	IFN γ	nd	0,140 \pm 0,009*	0,060 \pm 0,006*	0,015 \pm 0,003*
C57BL/6	m	TNF α	nd	0,247 \pm 0,007*	0,145 \pm 0,017*	0,061 \pm 0,008*
C57BL/6	w	TNF α	nd	0,168 \pm 0,015*	0,016 \pm 0,003*	0,006 \pm 0,002*
C57BL/6	m	IL-4	0,050 \pm 0,012	nd	nd	nd
C57BL/6	w	IL-4	0,290 \pm 0,070	nd	nd	nd
C57BL/6	m	IL-10	nd	nd	nd	nd
C57BL/6	w	IL-10	0,088 \pm 0,002	nd	nd	nd
C57BL/6	w	TGF β 1	0,389 \pm 0,010	0,261 \pm 0,016*	0,048 \pm 0,003*	nd
C57BL/6	w	TGF β 1	0,799 \pm 0,041	0,137 \pm 0,013*	0,023 \pm 0,003*	nd
BALB/c	m	IFN γ	1,860 \pm 0,044	0,430 \pm 0,035*	0,086 \pm 0,008*	nd
BALB/c	w	IFN γ	0,800 \pm 0,063	0,519 \pm 0,019*	0,027 \pm 0,003*	nd
BALB/c	m	TNF α	0,175 \pm 0,012	0,033 \pm 0,003*	0,011 \pm 0,001*	nd
BALB/c	w	TNF α	0,294 \pm 0,012	0,222 \pm 0,009 [†]	0,005 \pm 0,002*	nd
BALB/c	m	IL-4	nd	0,040 \pm 0,004*	0,014 \pm 0,001*	0,013 \pm 0,001*
BALB/c	w	IL-4	nd	0,207 \pm 0,015*	0,019 \pm 0,002*	0,008 \pm 0,002*
BALB/c	m	IL-10	nd	0,180 \pm 0,020*	0,158 \pm 0,009*	0,141 \pm 0,009*
BALB/c	w	IL-10	nd	0,060 \pm 0,015*	0,012 \pm 0,009*	0,002 \pm 0,001*
BALB/c	m	TGF β 1	0,082 \pm 0,003	0,438 \pm 0,021*	0,684 \pm 0,016*	0,127 \pm 0,010
BALB/c	w	TGF β 1	0,010 \pm 0,002	0,119 \pm 0,012*	0,731 \pm 0,028*	nd

*P \leq 0,0005, [†]P \leq 0,05 verglichen mit Kontrollen; nd = nicht detektierbar, G = Geschlecht.

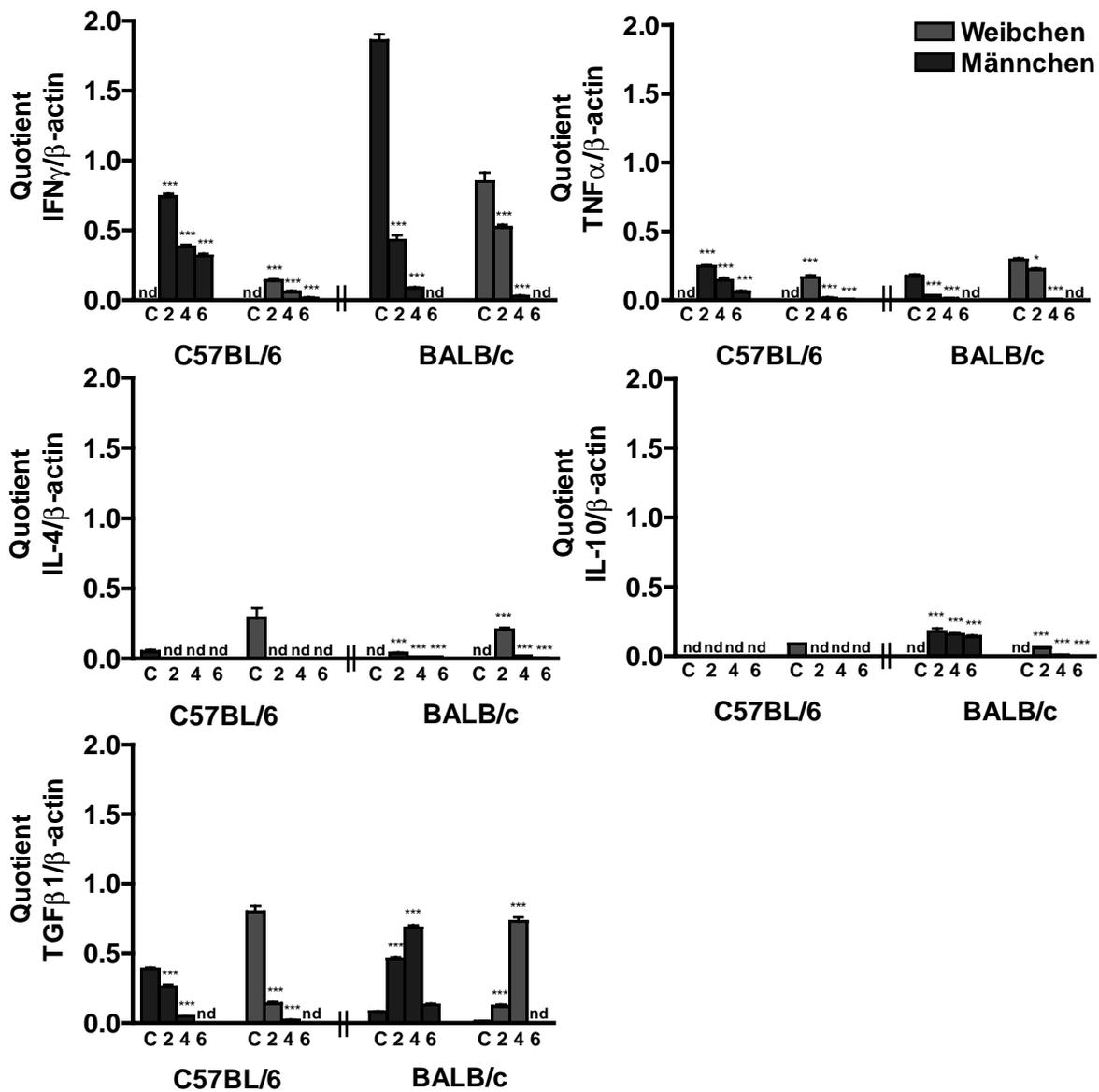


Abb. 11: In-vitro-RT-PCR-Bestimmung der Quotienten von IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10 und TGF β 1 zu β -Actin in Inseln von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts. Die isolierten Inseln wurden 30 min bei 37°C mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ inkubiert. Inseln, die mit dem Lösungsmittel von STZ behandelt wurden, dienten als Kontrollen (C). Jedes Zytokin und β -Actin wurde aus dem gleichen RNA-Pool untersucht. * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,0005$ vs unbehandelter Kontrolle. Die Daten geben Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

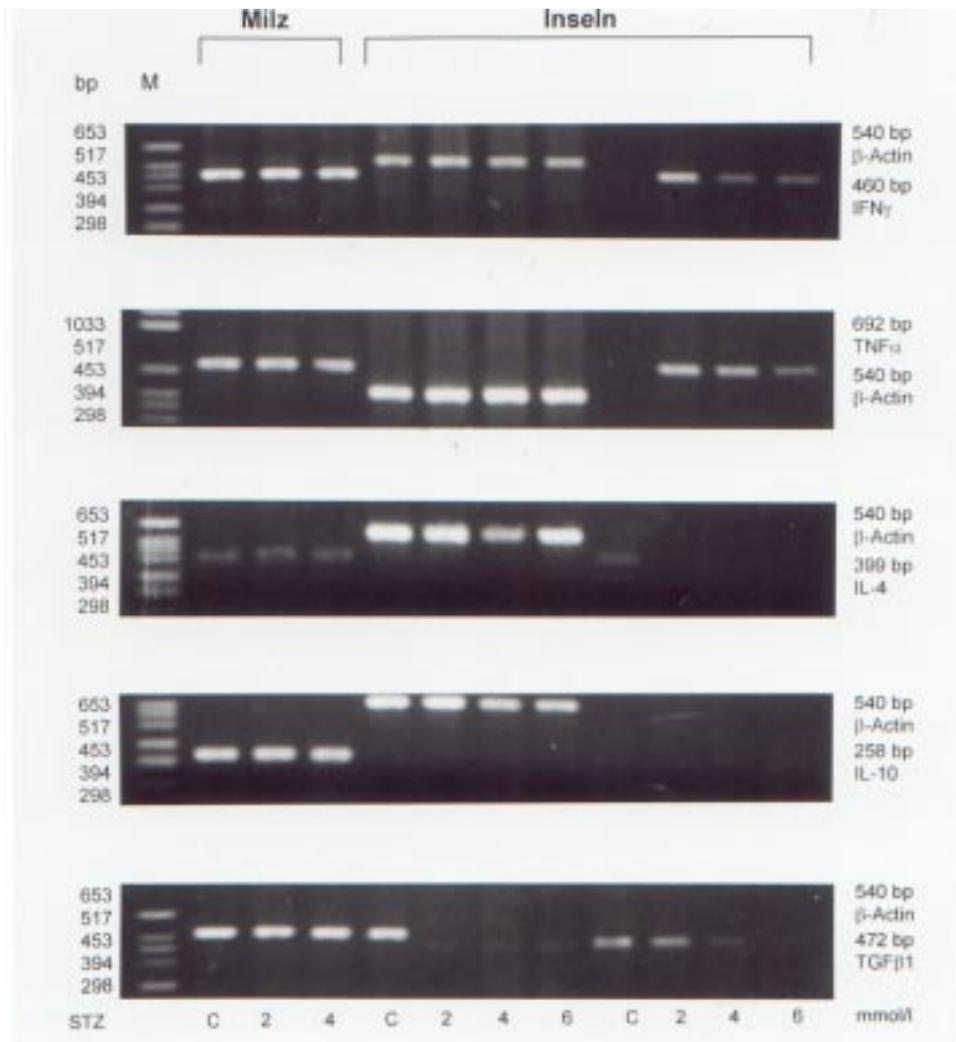


Abb. 12: Gelfotografien der In-vitro-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von männlichen C57BL/6-Mäusen. Die isolierten Inseln wurden 30 min bei 37°C mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ inkubiert. Inseln, die mit dem Lösungsmittel von STZ behandelt wurden, dienten als Kontrollen (C). Die Expression der jeweiligen Zytokine in Milzzellen diente als Kontrolle der Spezifität des verwendeten Primerpaares. M: Marker; bp: Basen-Paare

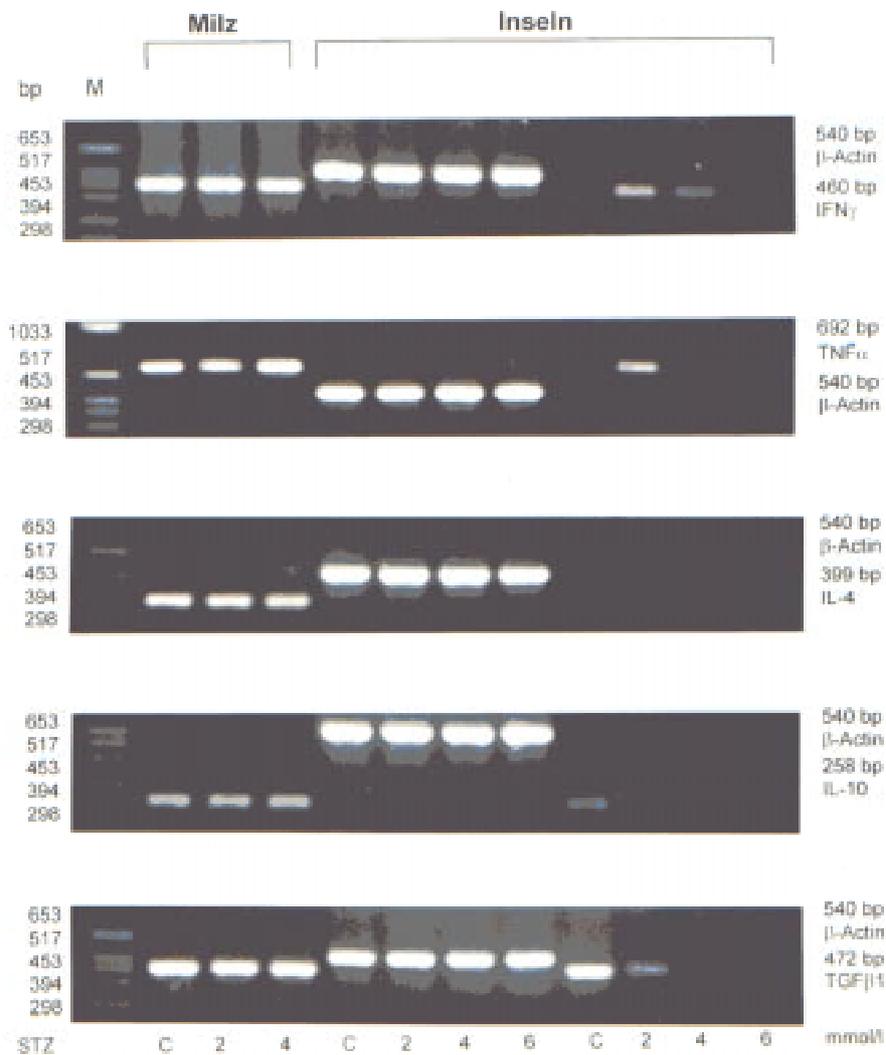


Abb. 13: Gelfotografien der In-vitro-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von weiblichen C57BL/6-Mäusen. Die isolierten Inseln wurden 30 min bei 37°C mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ inkubiert. Inseln, die mit dem Lösungsmittel von STZ behandelt wurden, dienten als Kontrollen (C). Die Expression der jeweiligen Zytokine in Milzzellen diente als Kontrolle der Spezifität des verwendeten Primerpaares. M: Marker; bp: Basenpaare

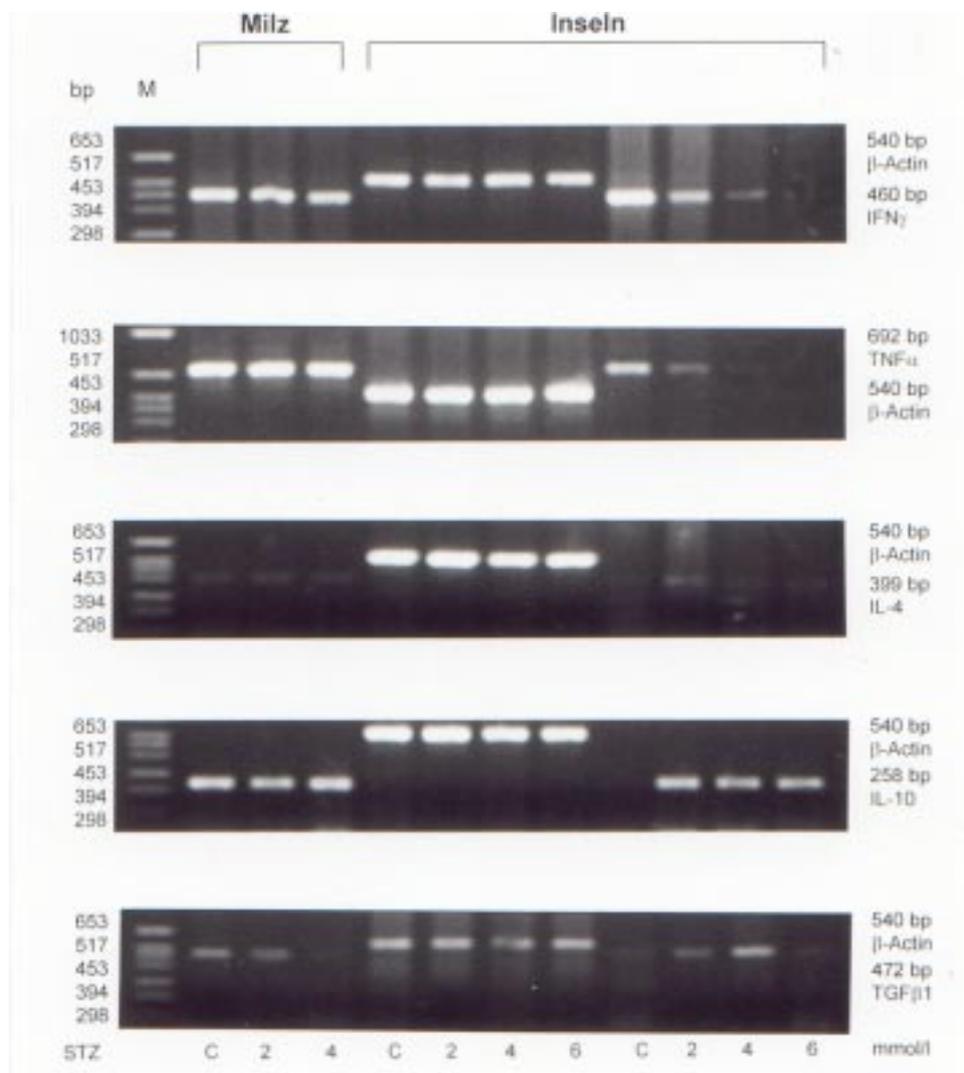


Abb. 14: Gelfotografien der In-vitro-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von männlichen BALB/c-Mäusen. Die isolierten Inseln wurden 30 min bei 37°C mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ inkubiert. Inseln, die mit dem Lösungsmittel von STZ behandelt wurden, dienten als Kontrollen (C). Die Expression der jeweiligen Zytokine in Milzzellen diente als Kontrolle der Spezifität des verwendeten Primerpaares. M: Marker; bp: Basen-Paare

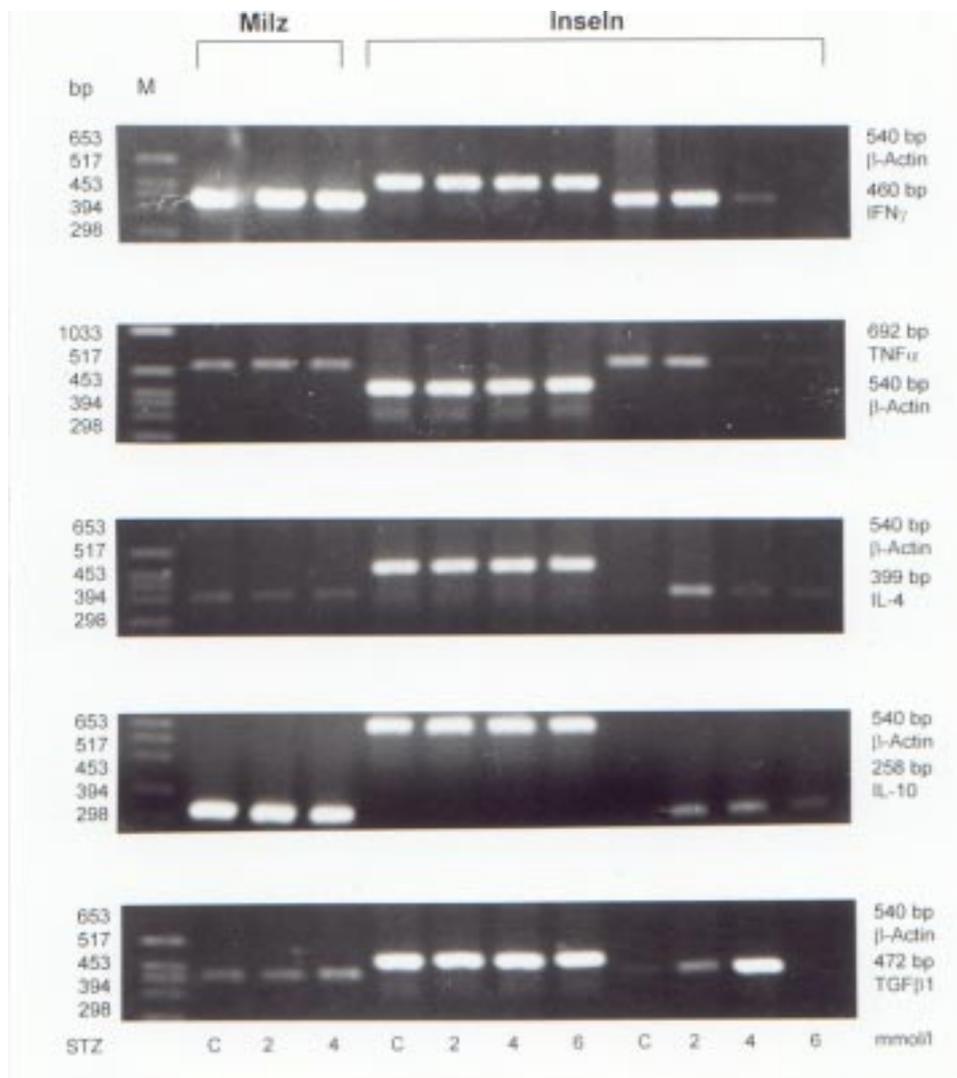


Abb. 15: Gelfotografien der In-vitro-RT-PCR Produkte der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, TGF β 1 und β -Actin in Inseln von weiblichen BALB/c-Mäusen. Die isolierten Inseln wurden 30 min bei 37°C mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ inkubiert. Inseln, die mit dem Lösungsmittel von STZ behandelt wurden, dienten als Kontrollen (C). Die Expression der jeweiligen Zytokine in Milzzellen diente als Kontrolle der Spezifität des verwendeten Primerpaares. M: Marker; bp: Basen-Paare

4.2.3. Berechnung der spektrophotometrisch bestimmten Gesamt-RNA-Konzentration/ 1000 Inseln

Wie in Tabelle 9 gezeigt, nahm die Anzahl isolierter Inseln von männlichen (m) und weiblichen (w) C57BL/6- und BALB/c-Mäusen mit steigender STZ-Konzentration ab. Mit dieser Reduktion der Anzahl isolierter Inseln ging jedoch keine signifikante Verringerung der Gesamt-RNA-Konzentration auf 1000 Inseln berechnet einher.

Tab. 9: Anzahl isolierter Inseln und errechnete Gesamt-RNA-Konzentration/ 1000 Inseln unbehandelter oder mit STZ-behandelter Inseln männlicher (m) und weiblicher (w) C57BL/6- und BALB/c-Mäuse. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten

	Kontrolle		STZ-Konzentration (mmol/l)					
			2		4		6	
Mausstamm	Anzahl Inseln	Gesamt RNA (μ g)/1000 Inseln	Anzahl Inseln	Gesamt RNA (μ g)/1000 Inseln	Anzahl Inseln	Gesamt RNA (μ g)/1000 Inseln	Anzahl Inseln	Gesamt RNA (μ g)/1000 Inseln
C57BL/6 m	971 \pm 48	20,03 \pm 0,78	983 \pm 17	19,59 \pm 0,32	837 \pm 38	20,37 \pm 0,62	697 \pm 21	19,65 \pm 0,83
C57BL/6 w	1011 \pm 17	19,70 \pm 0,02	973 \pm 30	19,54 \pm 0,25	845 \pm 26	19,21 \pm 0,72	655 \pm 23	18,86 \pm 0,27
BALB/c m	1007 \pm 23	19,06 \pm 0,45	1035 \pm 31	19,49 \pm 0,12	888 \pm 18	20,35 \pm 0,33	724 \pm 18	18,17 \pm 0,25
BALB/c w	1009 \pm 19	19,57 \pm 0,06	992 \pm 14	19,62 \pm 0,16	870 \pm 28	20,56 \pm 0,52	650 \pm 29	19,13 \pm 0,27

Nach der Isolierung der Langerhans-Inseln (s. 3.3.3.) wurden die Inseln mit 2, 4 oder 6 mmol/l STZ 30 min bei 37°C inkubiert (s. 3.3.5.) und nach der Inkubation die Anzahl der Inseln ermittelt; die RNA der Inseln wurde isoliert (s. 3.3.11.) und spektrophotometrisch bestimmt (s. 3.3.12.); berechnet wurde die Gesamt RNA/1000 Inseln.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, welche Effekte die Behandlung mit MLD-STZ und die In vitro-Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen STZ auf Th1-, Th2- und Th3-typische Zytokinprofile im Mikromilieu pankreatischer Inseln hat. Durch die Ex-vivo- und In-vitro-Untersuchung dieser Zytokinprofile in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts war es möglich, die Bedeutung von Zytokinprofilen bei der Diabetespathogenese zu bestimmen, weil nur männliche Empfängermäuse einen MLD-STZ-induzierten Diabetes entwickeln, während die weiblichen Mäuse neben unbehandelten Mäusen als Kontrollen dienten. Außerdem sind männliche C57BL/6-Mäuse relativ sensitiv für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes, während männliche BALB/c-Mäuse sich im Gegenteil als relativ resistent erweisen.

MLD-STZ zeigte unterschiedliche Effekt auf die mRNA-Expression und Produktion lokaler Zytokinprofile in pankreatischen Inseln beider untersuchter Mausstämme. Die Th1-typischen Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ wurden abhängig vom jeweilig untersuchten Mausstamm reguliert, während die Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 Mausstamm-spezifisch und in C57BL/6-Mäusen außerdem geschlechtsspezifisch reguliert wurden. Die Behandlung mit MLD-STZ steigerte $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ in Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene. Im Gegenteil dazu wurden diese Zytokine in Inseln von BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts durch MLD-STZ reduziert. Die Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 wurden in Inseln männlicher C57BL/6-Mäuse durch MLD-STZ verringert, blieben jedoch unbeeinflusst in Inseln weiblicher Spender und wurden im Gegensatz dazu in Inseln von BALB/c-Mäusen beiderlei Geschlechts gesteigert. In Übereinstimmung mit der induzierenden Wirkungsweise von MLD-STZ auf die mRNA der proinflammatorischen Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ wurde die mRNA des anti-inflammatorischen Zytokins $TGF\beta 1$ gegenreguliert. In vitro war die Wirkungsweise verschiedener Konzentrationen STZ auf die Th-typischen Zytokinprofile in isolierten Inseln vergleichbar mit den ex vivo beobachteten Effekten in Inseln MLD-STZ-behandelter Mäuse. Offensichtlich war die Empfänglichkeit für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes stärker mit der

Reduktion der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 verbunden, als mit der Induktion der Th1-typischen Zytokine IFN γ und TNF α . In Bezug auf die Steigerung von IFN γ und TNF α und die Reduktion von IL-4 und IL-10 durch MLD-STZ in Inseln von C57BL/6-Mäusen sind unsere Ergebnisse mit den von Herold et al. (1996) publizierten Untersuchungen in Pankreata männlicher C57BL/KsJ-Mäuse übereinstimmend. Die Autoren zeigen allerdings keine Ergebnisse zu Zytokinprofilen in Inseln weiblicher Mäuse als Kontrollgruppe. Aus diesem Grund ist es schwierig, die Rolle von IFN γ und TNF α bei der Diabetespathogenese zu bestimmen. Allerdings könnte die zerstörerische Wirkung der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α durch eine Reduktion der gegenregulatorisch wirkenden Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 noch gesteigert werden. Diese Annahme wird auch durch Untersuchungen im NOD-Mausmodell gestützt, wo eine Behandlung mit IL-4 (Mueller et al., 1996; Cameron et al., 1997; Tominaga et al., 1998) oder IL-10 (Pennline et al., 1994) vor einem Diabetes schützen konnte. Die Behandlung von NOD-Mäusen mit IFN γ und TNF α wiederum steigerte die Diabetesprävalenz (Campbell et al., 1991; Nicoletti et al., 1996). Die Wirkung von Th1- und Th2-typischen Zytokinen auf die Diabetespathogenese wird außerdem gestützt durch Experimente mit transgenen NOD-Mäusen. Die Überexpression von IFN γ (Sarvetnick et al., 1988) und TNF α (Grewal et al., 1996; Green et al., 1998) verstärkte diabetogene Prozesse und steigerte die Diabetesprävalenz, während IL-4-transgene (Mueller et al., 1996; Gallichan et al., 1999) und IL-10-transgene (Wogensen et al., 1994; Lee et al., 1996) NOD-Mäuse vor einem Diabetes geschützt waren.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und die von Herold und Mitarbeitern (1996) publizierte Arbeit zeigen, daß Immunreaktionen am MLD-STZ-induzierten Diabetes beteiligt sind, was durch die Aktivierung von Zytokin-produzierenden Zellen bewiesen wurde. Klinkhammer et al. (1988) berichteten, daß STZ ein Antigen oder Hapten ist, welches die lokale T-zellabhängige Lymphozytenproliferation stimuliert. Diese Befunde wurden durch detailliertere Analysen, die auch die Zytokin-produzierenden T-Zellsubtypen beinhalteten, erweitert (Albers et al., 1998; Koquet-Kastylevsky et al., 2000). In diesem Zusammenhang zeigen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten In-vitro-Befunde, daß sehr frühe STZ-Effekte die Immunaktivierung durch die Zytokinproduktion im Mikromilieu

pankreatischer Inseln auslösen könnten. STZ regulierte innerhalb von 30 min nach dem ersten Kontakt mit den Inseln das Gleichgewicht entweder zu Gunsten einer proinflammatorischen oder einer anti-inflammatorischen Immunantwort. Diese initialen Reaktionen könnten entscheidend für die Empfänglichkeit sein, einen MLD-STZ-Diabetes zu entwickeln. Die molekularen Mechanismen der Regulation von STZ-induzierten Zytokinprofilen sind jedoch noch ungeklärt. Vielleicht könnten Zytokin-induzierte reaktive Sauerstoffmoleküle als unspezifische Mediatoren Immunreaktionen stimulieren, da bekannt ist, daß H_2O_2 die Fähigkeit dendritischer Zellen steigert Antigene zu präsentieren und T-Zellen zu stimulieren (Rutault et al., 2000). Untersuchungen mit Hilfe der In-situ-RT-PCR könnte es ermöglichen, die Zellen zu definieren, welche die in dieser Arbeit beschriebenen Zytokine produzieren. Solche Untersuchungen könnten zur Entwicklung von Therapien für Patienten in der prädiabetischen Phase des Typ-1-Diabetes und in Individuen mit einem hohen Risiko an Typ-1-Diabetes zu erkranken, beitragen.

Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse, daß durch lokale Zytokinprofile gesteuerte Immunreaktionen zur Empfänglichkeit für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes beitragen. Offensichtlich war dabei die Steigerung Th1-typischer Zytokine alleine nicht ausreichend, einen Diabetes zu induzieren, da die Ex-vivo-Produktion von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ in Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts vergleichbar war. Ebenso war die MLD-STZ-induzierte Reduktion dieser Zytokine in Inseln von BALB/c-Mäusen vergleichbar. Auffallend war jedoch die deutliche MLD-STZ-induzierte Reduktion der Th2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10 nur in Inseln von männlichen C57BL/6-Mäusen, welche sensitiv für einen MLD-STZ-Diabetes sind. Somit scheint die Diabetesprävalenz eher mit einer Reduktion Th2-typischer Zytokine assoziiert zu sein. Diese Reduktion könnte das inflammatorische Potential der Th1-typischen Zytokine erhöhen. Diese Annahme ist stimmig mit den Ergebnissen in den relativ MLD-STZ-resistenten BALB/c-Mäusen, deren Ursache die MLD-STZ-gesteigerte Produktion der anti-inflammatorischen Th2- und Th3-typischen Zytokine sein könnte. Die Charakterisierung der Zytokinprofile im Mikromilieu pankreatischer Inseln könnte zeigen, ob initiale Prozesse im vaskulären Gewebe oder in β -Zellen selber ausgelöst werden.

6. Literaturverzeichnis

Albers R, de Heer C, Bol M, Bleumink R, Seinen W, Pieters R: Selective immunomodulation by the autoimmunity-inducing xenobiotics streptozotocin and HgCl₂. *Eur J Immunol* 28: 1233-1242, 1998

Almawi WY, Tamin H, Azar ST: T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1497-1502, 1999

Alonso S, Minty A, Bourlet Y, Buckingham M: Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warmblooded vertebrates. *J Mol Evol* 23: 11-22, 1986

Bach J-F: T cells and insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Top Endocrinol Diabetes* 2: 12-16, 1995

Balasa B, Sarvetnick N: The paradoxical effects of interleukin 10 in the immunoregulation of autoimmune diabetes. *J Autoimmunity* 9: 283-286, 1996

Bell RH, Sayers HJ, Pour PM, Ray MB, McCullough PJ: Importance of diabetes in inhibition of pancreatic cancer by streptozotocin. *J Surg Res* 46: 515-519, 1989

Berman MA, Sandborg CI, Wang Z, Imfeld KL, Zaldivar F, Dadufalza V, Buckingham BA: Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 157: 4690-4696, 1996

Billiau A: Interferon- γ : Biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 62: 61-130, 1996

Buschard K, Rygaard J: T-lymphocytes transfer streptozotocin-induced diabetes mellitus in mice. *Acta Path Microbiol Scand Sect C* 86: 277-282, 1978

Calcinaro F, Gambelunghe G, Lafferty KJ: Protection from autoimmune diabetes by adjuvant therapy in the non-obese diabetic mouse: The role of interleukin-4 and interleukin-10. *Immunol Cell Biol* 75: 467-471, 1997

Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, Delovitch TL: IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol* 159: 4686-4692, 1997

Campbell IL, Iscaro A, Harrison LC: Interferon- γ and tumor necrosis factor- α Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol* 141: 2325-2329, 1988

Campbell IL, Oxbrow L, Koulmanda M, Harrison C: IFN- γ induces islet cell MHC antigens and enhances autoimmune streptozotocin-induced diabetes in the mouse. *J Immunol* 140: 1111-1116, 1988

Candéias S, Katz J, Benoist C, Mathis D, Haskins K: Islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice express heterogenous T-cell repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6167-6170, 1991

Castano L, Eisenbarth GS: Type-I Diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 8: 647-679, 1990

Cavallo MG, Pozzilli P, Bird C, Wadhwa M, Meager A, Visalli N, Gearing AJH, Andreani D, Thorpe R: Cytokines in sera from insulin-dependent diabetic patients at diagnosis. *Clin Exp Immunol* 86: 256-259, 1991

Chang TL, Shea CM, Urioste S, Thompson RC, Boom WH, Abbas AK: Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes: III. Responses of IL-2 and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. *J Immunol* 145:2803-2808, 1990

Chomczynski P, Sacchi N: Singlestep method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987

Choquet-Katylevsky G, Ducluzeau M-T, Tedone R, Nicolas J-F, Descotes J: Increased production of interferon-gamma, but not IL-4 mRNA by streptozotocin in the popliteal lymphnode assay. *J Appl Toxicol* 20: 175-178, 2000

Cockfield SM, Ramassar V, Urmson J, Halloran PF: Multiple low dose streptozotocin induces systemic MHC expression in mice by triggering T cells to release IFN- γ . *J Immunol* 142: 1120-1128, 1989

Coffman RL, Seymour BWP, Lebman DH, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HFJ, Finkelman FD, Bond MW, Mosmann TR: The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 102: 5-28, 1988

Dahlén E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G: Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 160: 3585-3595, 1999

Dayer-Métroz M-D, Kimoto M, Izui S, Vassalli P, Renold AE: Effect of helper and/or cytotoxic T-lymphocyte depletion on low dose streptozotocin-induced diabetes in C57Bl/6J mice. *Diabetes* 37: 1082-1089, 1988

Delovitch TL, Singh B: The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: Immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7: 727-738, 1997

Eisenbarth GS: Type I diabetes mellitus: A chronic autoimmune disease. *N J Engl Med* 314: 1360-1368, 1986

Falcone M, Sarvetnick N: Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* 11: 670-676, 1999

Falcone M, Sarvetnick N: The effect of local production of cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Immunol* 90: 2-9, 1999

Farrar MA, Schreiber RD: The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Ann Rev Immunol* 11: 571-611, 1993

Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TM, Vitetta ES: Lymphokine-mediated regulation of the response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 168: 543-558, 1988

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095, 1989

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444-3451, 1991

Fox CJ, Danska JS: IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts nondestructive insulinitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 158: 2414-2424, 1997

Gajewski TF, Fitch F: Anti proliferative effect of IFN- γ in murine immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocytes clones. *J Immunol* 140: 4245-4252, 1988

Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW: Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. *Immunol Rev* 111: 79-110, 1989a

Gajewski TF, Joyce J, Fitch F: Anti proliferative effect of IFN- γ in murine immune regulation. III. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN- γ . *J Immunol* 143: 15-22, 1989b

Gallichan WS, Balasa B, Davies JD, Sarvetnick N: Pancreatic IL-4 expression in islet-reactive Th2 cells that inhibit diabetogenic lymphocytes in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 163: 1696-1703, 1999

Gaulton GN, Schwartz JL, Eardley DD: Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. *Diabetologia* 28: 769-775, 1985

Gerasmidi A, Sheehan KCF, Schreiber RD, Lacy PE: Tumor necrosis factor α prevents rejection of islet xenografts (rat to mouse). *Diabetes* 42: 651-657, 1993

Gotoh M, Maki T, Kiyozumi T, Satomi S, Monaco AP: An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40: 437-438, 1985

Green EA, Flavell RA: Tumor necrosis factor- α and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Rev* 169: 11-22, 1999

Grewal IS, Grewal KD, Wong FS, Picarella DE, Janeway CA, Flavell RA: Local expression of transgene encoded TNF- α in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells. *J Exp Med* 184: 1963-1974, 1996

Gu D, Arnush M, Sawyer P, Sarvetnick N: Transgenic mice expressing IFN- γ in pancreatic β -cells are resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol* 269: E1089-E1094, 1995

Hammond KJL, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG: α/β -T cell receptor (TCR)⁺CD4⁻CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin(IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187: 1047-1056, 1998

Hancock WW, Polanski M, Zhang J, Blogg N, Weiner HL: Suppression of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and -10, transforming growth factor- β and prostaglandin-E. *Am J Pathol* 147: 1193-1199, 1995

Healey D, Ozegbe P, Arden S, Chandler P, Hutton J, Cooke A: *In vivo* activity and *in vitro* specificity of CD4⁺ Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice. *J Clin Invest* 95: 2979-2985, 1995

Herold KC, Montag AG, Fitch FW: Treatment with anti-T-lymphocyte antibodies prevents induction of insulinitis in mice given multiple doses of streptozotocin. *Diabetes* 36: 796-801, 1987

Herold KC, Vezys V, Sun Q, Viktora D, Seung E, Reiner S, Brown DR: Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *J Immunol* 156: 3521-3527, 1996

Herold KC, Baumann E, Vezys V, Buckingham F: Expression and immune response to islet antigens following treatment with low doses of streptozotocin in H2^d mice. *J Autoimmunity* 10: 17-25, 1997

Herrath von MG, Oldstone MBA: Interferon- γ is essential for destruction of β cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 185: 531-539, 1997

Higuchi Y, Herrera P, Muniesa P, Huarte J, Belin D, Obashi P, Aichele P, Orci L, Vassali J-D, Vassalli P: Expression of a tumor necrosis factor α transgene in murine pancreatic β cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes. *J Exp Med* 176: 1719-1731, 1992

Hirai H, Kaino Y, Ito T, Kida K: Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of NOD mice. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13: 91-98, 2000

Huang X, Yuan J, Goddard A, Foulis A, James RFL, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA: Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44: 658-664, 1995

Hussain MJ, Maher J, Warnock T, Vats A, Peakman M, Vergani D: Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia* 41: 343-349, 1998

Jacob CO, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO, Acha-Orbea H: Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): Similarities between TNF- α and interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 968-972, 1990

Kallmann BA, Hüther M, Tubes M, Feldkamp J, Bertrams J, Gries FA, Lampeter EF, Kolb H: Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 46: 237-243, 1997

Katz JD, Benoist C, Mathis D: T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 268: 1185-1188, 1995

Kelso A: Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? *Immunol Today* 16: 374-379, 1995

Kiesel U, Kolb H: Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes is under the genetic control of the major histocompatibility complex in mice. *Diabetologia* 23: 68-71, 1982

King C, Davies J, Mueller R, Lee M-S, Krahl T, Yeung B, O'Connor E, Sarvetnick N: TGF-beta 1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* 8: 601-613, 1998

Klinkhammer C, Popowa P, Gleichmann H: Specific immunity to streptozotocin: Cellular requirement for induction of lymphoproliferation. *Diabetes* 37: 74-80, 1988

Kurrer MO, Pakala S, Hanson HL, Katz JD: β -cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 213-218, 1997

Lafaille JJ: The role of helper T cells in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 139-151, 1998

Lai Z-W, Hundeiker C, Gleichmann E, Esser C: Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of the aryl-hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol* 52: 30-37, 1997

Lawrence DA: Transforming growth factor β : a general review. *Eur Cytokine Netw* 7: 363-374, 1996

Le P, Leiter EH, Leyendecker JR: Genetic control of susceptibility to streptozotocin diabetes in inbred mice: Effect of testosterone and H-2 haplotype. *Endocrinology* 116: 2450-2455, 1985

Lee M-S, Mueller R, Wicker LS, Peterson LB, Sarvetnick N: IL-10 is necessary and sufficient for autoimmune diabetes in conjunction with NOD MHC homozygosity. *J Exp Med* 183: 2663-2668, 1996

Leiter EH: Differential susceptibility of BALB/c sublines to diabetes induction by multiple-dose streptozotocin treatment. *Curr Top Microbiol Immunol* 122: 78-85, 1985

Leiter EH, Beamer WG, Shultz LD: The effect of immunosuppression on streptozotocin-induced diabetes in C57BL/KsJ mice. *Diabetes* 32: 148-155, 1983

Leiter EH, Gerling IC, Flynn JC: Spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in nonobese diabetic (NOD) mice: Comparison with experimentally induced IDDM. *CRC Press LLC*: 257-294, 1999

Leiter EH, Le PH, Prochazka M, Worthen SM, Huppi K: Genetic and environmental control of diabetes induction by multiple-dose streptozotocin in two BALB/c substrains. *Diabetes Res* 9: 5-10, 1988

Letterio JJ, Roberts AB: Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu Rev Immunol* 16: 137-161, 1998

Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO: Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16: 34-38, 1995

Like AA, Rossini AA: Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus *Science* 193: 415-417, 1976

Lukic ML: Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol* 6: 119-128, 1998

MacDonald TT: T cell immunity to oral allergens. *Curr Opin Immunol* 10:620-627, 1998

MacDonald TT: Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites. *Curr Top Microbiol Immunol* 236: 113-135, 1999

Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Dinarello CA, Nerup J: Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic β -cell cytotoxicity. *J Immunol* 139: 4077-4082, 1987

Moore KW, O'Garra A, De Waal-Malefijt R, Viera P, Mosmann TR: Interleukin 10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-190, 1993

Moritani M, Yoshimoto K, Li S, Kondo M, Iwahana H, Yamaoka T, Sano T, Nakano N, Kikutani H, Itakura M: Prevention of adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice with IL-10-transduced islet-specific Th1 lymphocytes. *J Clin Invest* 98: 1851-1859, 1996

Mosmann TR: Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 56: 1-26, 1994

Mosmann TR, Coffman RL: Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 7: 145-173, 1989

Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-146, 1996

Mosmann TR, Schumacher JH, Street NF, Budd R, O'Garra A, Fong TAT, Bond MW, Moore KWM, Sher A, Fiorentino DF: Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺ T cells. *Immunol Rev* 123: 209-229, 1991

Mosmann TR; Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357, 1986

Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N: Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 184: 1093-1099, 1996

Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song Y-H, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N: Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon- γ transcription. *J Clin Invest* 95: 628-634, 1995

Mullis KB, Faloona F: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987

Mysliwska J, Zorena K, Skuratowicz-Kubica A, Mysliwski A : Significance of tumor necrosis factor α in patients with long-standing type-I diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 30: 158-161, 1996

Nicoletti F, Zacccone P, Di Marco R, Di Mauro M, Magro G, Grasso S, Stivala F, Calori G, Mughini L, Meroni PL, Garotta G: Paradoxical antidiabetogenic effect of γ -interferon in DP-BB rats. *Diabetes* 47: 32-38, 1998

Nicoletti F, Zacccone P, Di Marco R, Di Mauro M, Magro G, Grasso S, Mughini L, Meroni P, Garotta G: The effects of a nonimmunogenic form of murine soluble interferon- γ receptor on the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Endocrinology* 137: 5567-5575, 1996

O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ: Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol* 178: 176-181, 1996

O'Garra A: Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper subsets. *Immunity* 8: 275-283, 1998

Ohly P, Gleichmann H: Metallothionein: In vitro induction with zinc and streptozotocin in pancreatic islets of mice. *Exp Clin Endocrinol* 103: 79-82, 1995

Ohly P, Wang Z, Abel J, Gleichmann H: Zincsulphate induced metallothionein in pancreatic islets and protected against the diabetogenic toxin streptozotocin. *Talanta* 46: 355-359, 1998

Paik S-G, Fleischer N, Shin S-L: Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: Obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6129-6133, 1980

Paik S-G, Michaelis MA, Kim YT, Shin S: Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. *Diabetes* 31: 724-729, 1982

Pakala SV, Chivetta M, Kelly CB, Katz JD: In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 189: 1053-1062, 1999

Pakala SV, Kurrer MO, Katz JD: T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 186: 299-306, 1997

Paliard X, De Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chrétien I, Abrams J, De Vries J, Spits H: Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN- γ by activated human CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones. *J Immunol* 141: 849-855, 1988

Pauza ME, Neal H, Hagenbaugh A, Cheroutre H, Lo D: T-cell production of an inducible interleukin-10 transgene provides limited protection from autoimmune diabetes. *Diabetes* 48: 1948-1953, 1999

Pelegrin M, Devedjian JC, Costa C, Visa J, Solanes G, Pujol A, Asins G, Valera A, Bosch F: Evidence from transgenic mice that interferon- β may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 273: 12332-12340, 1998

Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M: Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 71: 169-175, 1994

Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, Rothman P: Lack of interferon- γ receptor β chain and the prevention of interferon- γ signaling in Th1 cells. *Science* 269: 245-247, 1995

Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE: Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 56: 727-777, 1987

Picarella DE, Katz A, Li C-B, Ruddle NH, Flavell RA: Transgenic tumor necrosis factor (TNF) α production in pancreatic islet leads to insulinitis, not diabetes. *J Immunol* 150: 4136-4150, 1993

Ploix C, Bergerot I, Fabien N, Perche S, Moulin V, Thivolet C: Protection against autoimmune diabetes with oral insulin is associated with the presence of IL-4 type 2 T-cells in the pancreas and pancreatic lymph nodes. *Diabetes* 47: 39-44, 1998

Powrie F, Coffman RL: Cytokine regulation of T-cell function: Potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* 14: 270-274, 1993

Prud'homme GJ, Piccirillo CA: The inhibitory effects of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in autoimmune diseases. *J Autoimmunity* 14: 23-42, 2000

Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A: Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon- γ , tumor necrosis factor, Lymphotoxin, and interleukin 1. *Diabetes* 37: 133-136, 1988

Rabinovitch A: Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet β -cell destruction. *Diabetes Rev* 1: 215-240, 1993

Rabinovitch A: Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 43: 613-621, 1994

Rabinovitch A: An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/ Metabolism Reviews* 14: 129-151, 1998

Rabinovitch A, Sorenson O, Suarez-Pinzon WL, Power RF, Rajotte RV, Bleackley RC: Analysis of cytokine mRNA expression in syngenic islet grafts of NOD mice: Interleukin 2 and interferon gamma mRNA expression correlate with graft rejection and interleukin 10 with graft survival. *Diabetologia* 37: 833-837, 1994

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W: Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 55: 1139-1149, 1998

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Sorenson O, Bleackley C, Power R, Rajotte RV: Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice. *Transplantation* 60: 368-374, 1995

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorenson O, Rajotte RV, Power RF: TNF- α down-regulates type 1 cytokines and prolongs survival of syngeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159: 6298-6303, 1997

Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL: Interleukin-4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 178: 87-99, 1993

Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH: Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today* 21: 479-483, 2000

Riley WJ, McConnell TJ, MacLaren NK, McLaughlin JV, Taylor G: The diabetogenic effects of streptozotocin in mice are prolonged and inversely related to age. *Diabetes* 30: 718-723, 1981

Romagnani S: Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12: 227-257, 1994

Rossini AA, Appel MC, Williams M, Like AA: Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes* 26: 916-920, 1977

Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF: Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 74: 2485-2489, 1977

Rossini AA, Williams M, Appel MC, Like AA: Complete protection from low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Nature* 276: 182-184, 1978a

Rossini AA, Williams M, Appel MC, Like AA: Sex differences in the multiple-dose streptozotocin model of diabetes. *Endocrinology* 103: 1518-1520, 1978b

Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR: Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radical Biol Med* 26: 232-238, 1999

Sander B, Andersson J, Andersson U: Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev* 119: 65-93, 1991

Sanvito F, Nichols A, Herrera P-L, Huarte J, Wohlwend A, Vassalli J-D, Orci L: TGF- β 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF- α , triggers insulin-dependent diabetes. *Biochem Biophys Res Comm* 217: 1279-1286, 1995

Sarukhan A, Lechner O, von Boehmer H: Autoimmune insulinitis and diabetes in the absence of antigen-specific contact between T cells and islet β -cells. *Eur J Immunol* 29: 3410-3416, 1999

Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA: Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon- γ *Cell* 52: 773-782, 1988

Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, Parslow T, Stewart T: Loss of pancreatic tolerance induced by β -cell expression of interferon- γ *Nature* 346: 844-847, 1990

Satoh J, Seino H, Tanake S-I, Shintani S, Ohta S, Tamura K, Sawai T, Nobunaga T, Oteki T, Kumagai K, Toyota T: Recombinant human tumor necrosis factor α suppresses autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Clin Invest* 84: 1345-1348, 1989

Serreze DV, Leiter EH: Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 140: 3801-3807, 1988

Sideras P, Noma T, Honjo T: Structure and function of interleukin 4 and 5. *Immunol Rev* 102: 191-212, 1988

Slaper-Kortenbach ICM, Admiraal LG, Kerr JM, van Leeuwen EF, von dem Borne AEGK, Tetteroo PAT: Flow-cytometric detection of terminal deoxynucleotidyl transferase and other intracellular antigens in combination with membrane antigens in acute lymphatic leukemias. *Blood* 72: 1639-1644, 1988

Strandell E, Sandler S: In vitro response to interleukin-1 β and streptozotocin in pancreatic islets isolated from male and female nonobese diabetic mice. *J. Endocrinol.* 153: 81-86, 1997

Szelachowska M, Kretowski A, Kinalska I: Decreased in vitro and IL-10 production by peripheral blood in first degree relatives at high risk of diabetes type-I. *Horm Metab Res* 30: 526-530, 1998

Tisch R, McDevitt H: Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85: 291-297, 1996

Tominaga Y, Nagata M, Yasuda H, Okamoto N, Arisawa K, Moriyama H, Miki M, Yokono K, Kasuga M : Administration of IL-4 prevents autoimmune diabetes but enhances pancreatic insulinitis in NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol* 86: 209-218, 1998

Trembleau S, Germann T, Gately MK, Adorini L: The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16: 383-386, 1995

Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10: 411-452, 1992

Wang B, Gonzalez A, Höglund P, Katz JD, Benoist C, Mathis D: Interleukin-4 deficiency does not exarbate disease in NOD mice. *Diabetes* 47: 1207-1211, 1998

Wang Z, Dohle C, Friemann J, Green BS, Gleichmann H: Prevention of high- and low-dose STZ-induced diabetes with D-glucose and 5-thio-D-glucose. *Diabetes* 42: 420-428, 1993

Wang Z, Gleichmann H: Glucose transporter 2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple-low-doses streptozotocin in mice. *Diabetes* 47: 50-56, 1998

Watson CJ, Demmer J: Procedures of cDNA cloning. In DNA cloning 1- Core techniques, Glover DM, Hanes BB, Eds. New York, Oxford University Press, p. 83-119, 1995

Weber C, Pernis B, Ting W, Rosenkrantz K, Reemtsma K: Murine streptozotocin diabetes: Influences of the major histocompatibility complex, genetic background and blood transfusion. *Diabetologia* 27: 160-162, 1984

Wilson GL, Leiter EH: Streptozotocin interactions with pancreatic β cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* 156: 27-54, 1990

Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA: Extreme Th1 bias of invariant V α 24J β Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391: 177-181, 1997

Wogensen L, Huang X, Sarvetnick N: Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin-10 in the islets of Langerhans. *J Exp Med* 178: 175-185, 1993

Wogensen L, Lee M-S, Sarvetnick N: Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of β cells in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 179: 1379-1384, 1994

Wolf J, Lilly F, Shin S-I: The influence of genetic background on the susceptibility of inbred mice to streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 33: 567-571, 1984

Wood SC, Rao TD, Frey AB: Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cell Immunol* 192: 1-12, 1999

Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ: The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 19: 2577-2585

Xiang M, Zacccone P, Di-Marco R, Harris R, Magro G, Di Mauro M, Meroni PL, Garotta G, Nicoletti F: Failure of exogenously administered interferon- γ or blockade of endogenous interleukin-4 with specific inhibitors to augment the incidence of autoimmune diabetes in male NOD mice. *Autoimmunity* 30: 71-80, 1999

Yang X-D, Tisch R, Singer SM, Cao ZA, Liblau RS, Schreiber RD, McDevitt HO: Effect of tumor necrosis factor α on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med* 180: 995-1004, 1994

Zimny S, Gogolin F, Abel J, Gleichmann H: Metallothionein in isolated pancreatic islets of mice: Induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen. *Arch Toxicol* 67: 61-65, 1993

7. Zusammenfassung

In der NOD-Maus spielen die inflammatorischen T-Helfer (Th) 1-typischen Zytokine Interferon (IFN) γ und Tumor Nekrose faktor (TNF) α eine kritische Rolle bei der spontanen Diabetespathogenese, wohingegen die anti-inflammatorischen Th2-typischen Zytokine Interleukin (IL)-4 und IL-10 protektiv wirken können. Im induzierten Diabetes-Modell der Maus mit multiplen niedrigen Dosen Streptozotocin (MLD-STZ) existieren dagegen keine vergleichbar umfassenden Analysen. Deshalb wurden in dieser Arbeit die In-vitro- und Ex-vivo-Effekte von STZ auf die mRNA- und die Proteinexpression der Zytokine IFN γ , TNF α , IL-4 und IL-10 in isolierten pankreatischen Inseln untersucht, sowie die mRNA-Expression des Transformierenden Wachstumsfaktors (TGF) β 1. C57BL/6- und BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts wurden intraperitoneal (i.p.) mit 40 mg/kg Körpergewicht STZ an fünf aufeinanderfolgenden Tagen injiziert und die Inseln an den Tagen 1 und 3 nach der fünften STZ-Injektion isoliert. Kontrollmäuse erhielten das Lösungsmittel von STZ. In Inseln von C57BL/6-Mäusen beiderlei Geschlechts stimulierte MLD-STZ vergleichsweise die Produktion von IFN γ und TNF α , reduzierte die Produktionsraten von IL-4 und IL-10 jedoch nur in Inseln männlicher Mäuse. Gegensätzliche Ergebnisse wurden in Inseln von BALB/c-Mäusen beobachtet. Hier verringerte MLD-STZ die Produktion von IFN γ und TNF α deutlich, steigerte aber signifikant die Raten von IL-4 und IL-10. Die Ergebnisse auf Proteinebene wurden durch die Untersuchung der mRNA-Expression bestätigt. Ferner zeigte MLD-STZ konträre Effekte auf die TGF β 1 mRNA-Expression verglichen mit der von IFN γ und TNF α . Die In-vitro Effekte von STZ auf isolierte Inseln waren weitgehend vergleichbar mit denen, mit MLD-STZ. Die Interaktion und das Gleichgewicht zwischen Th1-typischen und Th2-typischen Zytokinen könnte zu der Empfänglichkeit männlicher Mäuse beitragen, einen MLD-STZ-induzierten Diabetes zu entwickeln. Wahrscheinlich ist ein Übergewicht in Richtung Th2-typischer Zytokine mehr mit Resistenz gegen Diabetes verbunden, als die Induktion Th1-typischer Zytokine mit der Empfänglichkeit für einen MLD-STZ-induzierten Diabetes.

8. Abkürzungen

A	Ampere
A	Adenin
Ak	Antikörper
ALS	Anti-Lymphozyten-Serum
APC	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BFA	gepufferte Formaldehyd-Aceton-Lösung
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CD4	Oberflächenantigen auf T-Helfer-Zellen
CD8	Oberflächenantigen auf zytotoxischen T-Zellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTL	zytotoxische T-Lymphocyten
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphocyten-assoziiertes Antigen 4
D	Dalton
d	Tag
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTH	Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Foetales Rinder Serum
FITC	Fluoresceine-Iso-Thio-Cyanate
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 kg x m/s ²)
GLUT2	Glucosetransporter 2
h	Stunde
H-2	Histokompatibilitätskomplex der Maus
HBSS	Hanks Buffered Saline Solution
HD	Hoch-Dosis

HLA	Histokompatibilitätskomplex des Menschen
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KRBH	Kreb's Ringer Bicarbonet Hepes
l	Liter
m	Meter
mAk	monoklonale Antikörper
M ϕ	Makrophagen
MFI	Mean Fluorescence Intensity
3-O-MG	3-O-Methyl-Glukose
MHC	Haupt Histocompatibilitäts Komplex
MLD	multiple niedrige Dosen
mol	molar
min	Minuten
mRNA	Boten RNA
μ	Mikro
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
nd	nicht detektierbar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO \cdot	Stickstoffmonoxid
NOD	Non-Obese-Diabetic
O $_2^{\cdot-}$	Sauerstoffradikal-Anion
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenteaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNA $_{\text{sin}}$	Ribonucleaseinhibitor
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RT	Reverse Transkriptase
sek	Sekunden

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Stat	Signal-Transducer und Activator der Transkription
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
T-bet	T-box in T-Zellen exprimiert
TE	Tris-EDTA
Tc	zytotoxische T-Zellen
TCR	T-Zellrezeptor
TGF β_1	Transformierender Wachstumsfaktor β_1
Th	T-Helfer Zellen
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts	Suppressor T-Zellen
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Nachname: Müller
Vorname: Andreas
Adresse: Dionysiusstr. 19, 47798 Krefeld
Geburtsort: 47798 Krefeld
Geburtstag: 09.08.1967
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1973-1977 Besuch der bischöflichen Maria-Montessori Grundschule in Krefeld
1977-1983 Besuch der bischöflichen Maria-Montessori Gesamtschule in Krefeld
1983-1986 Besuch der gymnasialen Oberstufe der bischöflichen Maria-Montessori Gesamtschule in Krefeld, Abitur am 04.06.1986

Grundwehrdienst

1987-1988 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr

Hochschulausbildung

1986 Betriebspraktikum im Institut für Klinische Chemie der Städtischen Krankenanstalten in Krefeld
WS 1986/87 Abgebrochenes Chemiestudium an der Fachhochschule Niederrhein in Krefeld
WS 1988/89 Beginn des Biologiestudiums an der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf

- 1992 Diplom-Vorprüfungen für Biologen im Oktober 1992
- 1993 Arbeit als studentische Hilfskraft am Institut für Lasermedizin, Arbeitsgruppe molekulare Wirkstoff-Forschung vom 01.10.1993 - 29.11.1993
- 1994 Diplom-Prüfungen für Biologen im Oktober-November 1994. Hauptfächer: Biochemie, Immunologie
- 1995 Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Marion Schneider im Immunologischen Labor des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, Abschluß der Arbeit am 27.03.1996
- Arbeit als studentische Hilfskraft für das Institut für medizinische Psychologie vom 09.08.1995 - 10.11.1995
- 1996 Besuch der versuchstierkundlichen Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes vom 04.03.1996 - 20.03.1996
- 1996 Mitarbeit an einem befristeten Forschungsprojekt zum Thema „Hormonresistenz beim Endometriumkarzinom“ in der Zeit vom 01.04. 1996 - 31.10.1996 zur Erlernung molekularbiologischer Techniken
- 1996-1997 Arbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Marion Schneider im Immunologischen Labor des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf vom 01.12.1996 - 01.07.1997.
- 1997-2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf angefertigt

Publikationen

a) Abstracts:

Müller A, Wang Z, Ohly P, Gleichmann H: Streptozotocin induziert in vitro die mRNA-Expression von T-Helferzell-1-Zytokinen in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen. *Diab. Stoffw.* 7: 94, 1998

Müller A, Wang Z, Gleichmann H: In-vitro-Induktion von Zytokinen der Typ-1 T-Helferzellen in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen. *6. Inselworkshop der Deutschen Diabetes Gesellschaft; 4.-5.12. 1998 in Hannover, 1998*

Müller A, Gleichmann H: In-vitro-Induktion von Zytokinen der Typ-1 T-Helferzellen in pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen. *Diab. Stoffw.* 8: 62, 1999

Müller A, Gleichmann H: In vitro effects of the diabetogen streptozotocin on cytokine profiles in islets of mice. *Immunobiology* 200 (3-5): 443, 1999

Müller A, Gleichmann H: In vitro effects of streptozotocin on cytokine profiles in pancreatic islets of mice. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 108 (Suppl. 1): S139, 2000

b) Abstracts und Vorträge:

Müller A, Gleichmann H: The diabetogen streptozotocin differentially regulates Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice in vivo. *Immunobiology* 203 (1-3): 527, 2000

c) Originalarbeiten:

Müller A, Ohly P, Dohle C, Gleichmann H: Multiple Low Doses of Streptozotocin Differentially Regulate Th1-Type and Th2-Type Cytokine Profiles in Pancreatic Islets of C57BL/6 and BALB/c Mice. *Eingereicht* 2000.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Düsseldorf, den 3. Januar 2001