

**Aus der Klinischen Abteilung des  
Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. A. Scherbaum**

**Untersuchungen zum Darmimmunsystem von  
autoimmun-diabetischen NOD-Mäusen**

**Dissertation**

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

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

vorgelegt von

Katja Kirchhoff

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch M.A., Dekan  
Referent: Prof. Dr. Kolb  
Korreferent: Prof. Dr. vom Dahl

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>Diabetes Mellitus</b>	<b>8</b>
1.1	Diabetes vom Typ 1 . . . . .	8
1.2	Ätiologie . . . . .	8
1.3	Immunologische Aspekte in der Ätiologie des insulinabhängigen Diabetes Mellitus Typ 1 . . . . .	9
1.4	Tiermodell zum Typ 1 Diabetes und dessen Bedeutung für diese Arbeit . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Zytokine</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Blei</b>	<b>11</b>
3.1	Immunmodulatorische Wirkung von Blei . . . . .	12
<b>4</b>	<b>Darmimmunsystem</b>	<b>12</b>
4.1	Darmimmunsystem und Diabetes . . . . .	13
4.2	Orale Toleranz . . . . .	13
4.2.1	„Bystander Suppression“ und deren Bedeutung für die Therapie von Autoimmunkrankheiten . . . . .	14
4.2.2	Verlauf und Modulation der oralen Toleranz . . . . .	15
<b>5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>15</b>
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
6.1	Versuchstiere (Mäuse) . . . . .	17
6.2	Geräte . . . . .	17
6.3	Verbrauchsmaterial . . . . .	19
6.4	Substanzen . . . . .	19
6.5	Medium und Reagenzien für Zellkultur . . . . .	20
6.6	Puffer und Lösungen . . . . .	20
6.6.1	Zellkultur . . . . .	20
6.6.2	ELISA . . . . .	21
6.6.3	RT-PCR und Southern Blot . . . . .	22
6.7	Oligonukleotide für die RT-PCR . . . . .	24
<b>7</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
7.1	Behandlung und Präparation der Tiere . . . . .	25
7.2	Semiquantitative Bestimmung der mRNA (RT-PCR) . . . . .	26
7.2.1	RNA-Isolation aus Gewebe . . . . .	26
7.2.2	Spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration . . . . .	26
7.2.3	Reverse Transkription . . . . .	26
7.2.4	PCR . . . . .	27

7.2.4.1	PCR für die Versuche zum natürlichen Verlauf der Darmzytokinexpression und zur oralen Toleranz mit oraler Bleichloridbehandlung . . . . .	27
7.2.4.2	DNA-Elektrophorese . . . . .	28
7.2.4.3	Quantifizierung der PCR-Produkte . . . . .	28
7.2.5	PCR für die Versuche zur oralen Toleranz mit subkutaner Bleichloridbehandlung . . . . .	29
7.2.5.1	Agarosegelelektrophorese . . . . .	30
7.2.5.2	Blotten der Elektrophoresegele . . . . .	30
7.3	Southern Blot . . . . .	30
7.3.1	Insertisolierung . . . . .	31
7.3.2	Radioaktive Markierung der Inserts . . . . .	32
7.3.3	Aufreinigung über die Säule . . . . .	32
7.3.4	Hybridisierung . . . . .	33
7.4	Isolation von Milzzellen und Lymphknotenzellen aus der Maus . . . . .	33
7.4.1	Anreicherung der T-Zellen . . . . .	33
7.4.2	FACScan Analyse . . . . .	34
7.5	[3H]-Thymidin-Proliferationsassay . . . . .	34
7.5.1	Milz-T-Zellen . . . . .	34
7.5.2	Lymphknotenzellen . . . . .	34
7.6	Zytokinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA in Kulturüberständen . . . . .	35
7.6.1	TGF- $\beta$ ELISA . . . . .	35
7.6.2	IL-10 und IFN- $\gamma$ -ELISA . . . . .	36
7.6.3	ELISA zum Nachweis OVA-spezifischer Antikörper . . . . .	37
7.7	Statistische Auswertung . . . . .	38

### **III ERGEBNISSE 39**

#### **8 Natürlicher Verlauf der altersabhängigen Zytokingenexpression 39**

#### **9 Einfluß von subkutaner PbCl<sub>2</sub>- Applikation auf die Zytokingenexpression im Dünndarm und die Induktion von oraler Toleranz gegen OVA 45**

9.1	Modulation der OVA-spezifischen Immunreaktion von Milz-T-Zellen durch PbCl <sub>2</sub> bei NOD-Mäusen . . . . .	49
9.2	Modulationen auf Antikörperebene . . . . .	50

#### **10 Effekte einer oralen Behandlung mit PbCl<sub>2</sub> auf die orale Toleranz bei 10 Wochen alten NOD-Mäusen 51**

10.1	Effekte von PbCl <sub>2</sub> auf die Lymphozytenproliferation in peripheren Lymphknoten . . . . .	53
------	--	----

#### **11 Effekte einer oralen PbCl<sub>2</sub>-Behandlung bei NOD-Mäusen ohne Toleranzinduktion 55**

### **IV DISKUSSION 58**

<b>12 Verschiebung der Zytokinproduktion in Richtung Th1 beim Auftreten eines Diabetes Mellitus in NOD-Mäusen</b>	<b>58</b>
<b>13 Veränderung des Zytokinmusters im Darmgewebe von NOD-Mäusen durch Antigenkontakt</b>	<b>62</b>
<b>14 Modulation des Immunsystems von NOD-Mäusen durch PbCl<sub>2</sub></b>	<b>63</b>
14.1 Subkutane PbCl <sub>2</sub> Applikation . . . . .	63
14.2 Direkte Immunmodulation des Darmimmunsystems durch orale PbCl <sub>2</sub> -Behandlung . . . . .	65
14.3 Orale PbCl <sub>2</sub> -Behandlung ohne gleichzeitigen Antigenkontakt . . .	66
<b>15 Mechanismen der durch PbCl<sub>2</sub> vermittelten Effekte</b>	<b>66</b>
 <b>V LITERATUR</b>	 <b>69</b>
 <b>VI ANHANG</b>	 <b>88</b>
16 Danksagung	88
17 Lebenslauf	89
 <b>VII ZUSAMMENFASSUNG</b>	 <b>90</b>

### Abkürzungsverzeichnis:

ABTS	2,2-Ayino-bis(3-Ethylbenzo-Thiazoline-6-Sulfonic Acid)
a.u.	arbitrary units
bp	Basenpaare
BLU	Boehringer Light Units
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFA	Complete Freund´s Adjuvant
kD	kilo Dalton (Molmassen-Einheit)
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
Ethidiumbromid	5-Ethyl-3,8-diamino-6-phenyl-Phenanthridiniumbromimid
FACScan	fluorescence activated cell scanner (Fluoreszenz-aktivierter Zellanaly- sator)
FBS	Fetal Bovine Serum
GALT	Gut Associatet Lymphatic Tissue
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HRP	Horseradish Peroxidase
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysacharid

ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NOD	Non Obese Diabetic
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PJ	Propidiumjodid
PKC	Proteinkinase C
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	Subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Salinecitrat
STE	Saline, Tris, EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris, Borat, EDTA
TE	Tris, EDTA
Th	T-Helferzelle
TGF	Transforming Growth Factor
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween	20 Polyoxyethylsorbitmonolaureat
UV	Ultraviolett

# Teil I

## EINLEITUNG

### 1 Diabetes Mellitus

Bei Diabetes Mellitus handelt es sich um eine Erkrankung multifaktorieller Genese, die durch absoluten oder relativen Insulinmangel zu hyperglykämischen Zuständen führt.

Die Prävalenz liegt in Deutschland für alle Diabetesformen zusammen bei 4-5%, für Typ 1 Diabetes bei 0,1-0,3% der Gesamtbevölkerung. Man unterscheidet den in der Regel bei jüngeren Patienten auftretenden Typ 1 Diabetes, bei dem es durch selektive Destruktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu einem absoluten Insulinmangel kommt, und den meist bei älteren Personen auftretenden Typ 2 Diabetes. Bei diesem herrscht eine Endorganresistenz gegenüber Insulin vor.

Beide Diabetestypen bringen diverse akute und chronische Komplikationen mit sich. Hierzu gehören komatöse Zustände durch Hypo- bzw. Hyperglykämien sowie durch Laktat- und Ketoazidose im Rahmen von Diät- oder Behandlungsfehlern und bei Krankheitsmanifestation. Durch ständig schlecht eingestellten Diabetes kommt es zu Mikro- und Makroangiopathie und deren Folgen wie Myocardinfarkt und Apoplex, zu Polyneuropathie und Nierenversagen. Alle Komplikationen stellen für die betroffenen Personen eine Gefährdung dar und schränken die Lebensqualität beträchtlich ein.

#### 1.1 Diabetes vom Typ 1

Bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes kommt es in den Pankreasinseln zu inflammatorischen Prozessen mit Lymphozyten-, Makrophagen- und Monozyteninfiltration. Die hier angesiedelten insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen werden nach und nach vom Immunsystem zerstört bis zum weitgehenden Verlust der körpereigenen Insulinproduktion. Das zur Glukoseverwertung der Körperzellen notwendige Insulin muß deshalb substituiert werden.

Es kommt erst dann zur klinischen Manifestation des Diabetes, wenn bereits mehr als 80% der  $\beta$ -Zellen zugrunde gegangen sind. Bis dahin kann die Insulitis schleichend über Monate bis Jahre verlaufen [7].

#### 1.2 Ätiologie

Für die Entstehung des Typ 1 Diabetes werden viele Faktoren als verursachend postuliert. Dabei kommt es wahrscheinlich zu einem Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen [8, 9, 10].

Die Konkordanzrate von 30-40% bei eineiigen Zwillingen weist auf eine deutliche Beteiligung genetischer Faktoren hin [8]. Träger der HLA-Merkmale DR3 und DR4 weisen ein signifikant erhöhtes Risiko auf, an Typ 1 Diabetes zu erkranken [11, 12]. Wahrscheinlich existieren noch verschiedene andere Gene, die mit der Entstehung des Typ 1 Diabetes in Zusammenhang stehen [13, 192]. Wäre der genetische Aspekt der ätiologische Hauptfaktor, müßte die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen noch höher sein, und innerhalb einer Familie müßten häufiger mehr Personen von der Krankheit betroffen sein. Wahrscheinlich sind

also noch andere Faktoren maßgeblich an der Entstehung eines Typ 1 Diabetes beteiligt. Hierzu zählen verschiedene Viren wie z.B. Mumps-, Masern- oder Ebstein-Barr Viren, Ernährungsgewohnheiten, Chemikalien und Umwelttoxine [7, 8]. Außerdem sind jahreszeitliche und geographisch bedingte Unterschiede der Krankheitsinzidenz zu beobachten.

### 1.3 Immunologische Aspekte in der Ätiologie des insulinabhängigen Diabetes Mellitus Typ 1

Es wird vermutet, daß autoreaktive zytotoxische T-Zellen und Makrophagen zu einer selektiven  $\beta$ - Zellen Destruktion führen [14]. In der Tat entsteht durch Transplantation von Knochenmarkzellen eines Typ 1 Diabetikers in einen HLA-kompatiblen, nicht diabetischen Angehörigen, auch bei diesem nach einiger Zeit Diabetes [15, 16, 17]. Nach Transplantation von Pankreasgewebe eines HLA-identischen Verwandten in einen Diabetiker werden die Pankreasinseln des Transplantats mit mononukleären Entzündungszellen infiltriert, und es kommt zum Wiederauftreten des insulinabhängigen Diabetes (IDDM) [18].

Dies verdeutlicht, daß eine (Auto-)Immunantwort eine Ursache der  $\beta$ - Zellen Destruktion ist. Ein weiterer Hinweis auf die immunologische Genese ist, daß immunsuppressive Agenzien, die hauptsächlich auf T-Zellen wirken, die Progression eines IDDM verlangsamen [19, 20, 21, 193, 194].

Autoantikörper bzw. B-Lymphozyten scheinen pathogenetisch im Tierexperiment keine entscheidende Rolle zu spielen, denn IDDM läßt sich zwar durch T-Lymphozytentransfer auf Kontrolltiere übertragen, aber nicht durch Serum [22, 23].

Dennoch können bei vielen Patienten Autoantikörper gegen Inselzellantigene, wie z.B. Insulin und Glutaminsäuredecarboxylase nachgewiesen werden. Diese spielen bei der Frühdiagnostik des Typ 1 Diabetes eine wichtige Rolle [24].

Zu beachten ist die Tatsache, daß Typ 1 Diabetes häufig mit anderen Autoimmunkrankheiten koexistiert [25].

Auch verschiedene von T-Zellen freigesetzte Zytokine scheinen eine Rolle zu spielen. In der Gruppe der T-Zellen unterscheidet man grob zwischen T-Helfer-, T-Suppressor- und zytotoxischen T-Zellen. Die Gruppe der T-Helfer-Zellen (Th) unterteilt man in Abhängigkeit von ihren Funktionen, den von ihnen gebildeten Zytokinen und ihren Reaktionen auf Zytokine in drei Gruppen, Th1-3 [195, 196, 197, 60].

So wirken von Th1-Zellen gebildete Zytokine im Tierversuch eher proinflammatorisch und sezernieren z.B.  $\text{IFN-}\gamma$   $\text{TNF-}\alpha$  und IL-12, die von Th2-Zellen wirken eher protektiv mit Sekretion von z.B. IL-4 und IL-10 [26, 61]. Zellen vom Th-3 Typ sezernieren bevorzugt  $\text{TGF-}\beta$ . Verglichen mit Th1 und Th2 Zellen sind sie Deletion gegenüber etwas resistenter [198].

### 1.4 Tiermodell zum Typ 1 Diabetes und dessen Bedeutung für diese Arbeit

Viele der oben beschriebenen Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen an NOD-Mäusen (non-obese-diabetic) gewonnen. Bei diesen sind 6-8 Wochen post partum erste inflammatorische Inselassoziationen nachweisbar, und nach ca. 3-6 Monaten post partum werden 60-80% der weiblichen NOD-Mäuse auch unter keimfreien Bedingungen spontan diabetisch [233]. Es handelt sich hierbei um einen

autoimmunen Diabetes, der dem menschlichen Typ 1 Diabetes weitgehend ähnelt [199, 200, 201] und bei dem, wie beim Menschen, sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Weiterhin können bei diesen Tieren immunologische Besonderheiten nachgewiesen werden. Hierzu zählt eine funktionelle Dysfunktion antigenpräsentierender Zellen und verschiedene Abweichungen bei der Produktion regulatorischer Zytokine [27, 28, 29].

Durch Immunmodulationen mittels verschiedener, das Immunsystem beeinflussender Stoffe, pränatale Deletion einzelner Zytokingene oder postnataler Blockade bestimmter Zytokine durch spezifische Antikörper bzw. zusätzliche Zytokingabe, aber auch durch Depletion einzelner Zellgruppen lassen sich detailliert spezifische Aspekte beurteilen [26, 30, 31, z.B.]. Wichtige Hinweise auf die Bedeutung einzelner Faktoren und deren Zusammenwirken mit anderen können so gewonnen werden. Hierbei kommt dem Untersucher zugute, daß der Krankheitsverlauf in NOD-Mäusen relativ gut vorhersehbar ist. Auch ein großer Teil der für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden an NOD-Mäusen vorgenommen.

## 2 Zytokine

Zytokine sind insbesondere von Zellen des Immunsystems gebildete Polypeptide [32]. Sie regulieren das Ausmaß einer entzündlichen Reaktion oder einer Immunantwort [41]. Ihre Wirkung entfalten sie über Bindung an spezifische Zytokinrezeptoren auf Zellmembranen. Sie sind unter anderem maßgeblich an der Differenzierung von T-Zellen in Richtung Th1, Th2 oder Th3 beteiligt und beeinflussen damit ihre Produktion gegenseitig [9]. Verallgemeinernd läßt sich sagen, daß von Th1-Zellen gebildete Zytokine, z.B. IFN- $\gamma$  (Interferon), Th1-Zellen zur vermehrten Produktion anregen und gleichzeitig Th2 und Th3 Zellen hemmen [33, 34, 35]. Sie fördern in erster Linie die zellmedierte Immunantwort [101, 176, 144] und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des IDDM in NOD-Mäusen [224].

Zytokine von Th2 z.B. IL-10, IL-4 (Interleukin) und Th3- Zellen, TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor), fördern gegenseitig ihre Produktion, wirken aber hemmend auf Th1-Zellen [36]. Th2-Zellklone und deren Zytokine sind optimale Stimulatoren für die B-Zellen abhängige also humorale Immunantwort [37, 9]. Es wird angenommen, daß ein Überwiegen einer Th2 Reaktion des Immunsystems vor T-Zell-medierten Autoimmunkrankheiten schützen kann [171, 202].

Die durch Mitogene ausgelöste Zytokinmusteränderung ist teilweise altersabhängig. So nimmt z.B. die IL-2 Produktion mit dem Alter ab, die IFN- $\gamma$  und IL-4 Produktionen nehmen zu [38].

Zytokine spielen demnach eine zentrale Rolle innerhalb des Immunsystems. Da das von Th3-Zellen gebildete Zytokin *TGF- $\beta$*  in der Lage ist, viele Immunantworten zu vermindern [85], ist es wichtig für die Entstehung der oralen Toleranz, auf die in einem eigenen Abschnitt näher eingegangen wird. Es hat grundlegende Effekte auf Entwicklung und Physiologie [90] und ist an der Regulation von Lymphozytenproliferation und deren Extravasation beteiligt. Ein TGF- $\beta$  Mangel, z.B. durch Deletion des Gens, führt bei Mäusen zum „rapid wasting syndrom“ mit Kräfteverfall, rapidem Gewichtsverlust bis hin zum Tod nach ca. 3-4 Wochen. In vielen Organen kommt es zu einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion [50]. Colitis ist hierbei vorherrschend. Weiterhin

wurde von Sarvetnick et al. 1998 [170, 171] gezeigt, daß TGF- $\beta$  wenn es transgen in Pankreas  $\beta$ -Zellen exprimiert wird, vor einem Typ 1 Diabetes schützen kann. Möglicherweise ist es sogar in der Lage autoreaktive T-Zellen direkt zu supprimieren [172].

*IL-10* ist wahrscheinlich ein wichtiger Immunregulator im Intestinaltrakt [49]. Ein IL-10 Defizit führt zu Wachstumsretardierung, Anämie und chronischer Enterocolitis. Es wird vermutet, daß es ein natürlicher Suppressor für Kontakthypersensitivität ist [91]. Systemische Gabe von IL-10 schützt vor dem Auftreten eines Typ 1 Diabetes [173, 136], jedoch kam es in einer Studie mit transgenen NOD-Mäusen, die in den Pankreasinseln IL-10 exprimierten, zu einem verfrühten Auftreten der Krankheit [174, 175]. Neben seinen immunsuppressiven und antiinflammatorischen Eigenschaften [177] sind diverse immunstimulierende Eigenschaften dieses Zytokins bekannt [178, 179, 180, 181, 203, 204].

*IFN- $\gamma$*  wirkt hauptsächlich proinflammatorisch. Zum Beispiel ist es bei Colitis in der Darmschleimhaut vermehrt vorhanden [48]. In vitro führt IFN- $\gamma$  zu einer vermehrten  $\beta$ -Zellen Destruktion im Pankreas [9]. Die transgene Expression des Zytokins in  $\beta$ -Zellen führt zu schwerer Insulitis und IDDM [137]. Dennoch könnte IFN- $\gamma$  auch direkte immunsuppressive Effekte auf T-Zellen haben [205, 206, 207] und T-Zellen Apoptose induzieren [140].

Die biologisch aktive Form des *IL-12*, p70 (70kD) besteht aus einer 40 kD (p40) und einer 35 kD (p35) Untereinheit [145, 208, 209] und wird hauptsächlich von Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen gebildet. Sie trägt maßgeblich zur Entwicklung von T-Zellen zu Th1-Zellen bei [143, 144, 145, 146, 223]. Für die zellmedierte Immunität ist IL-12 von entscheidender Bedeutung [145]. Je nachdem in welcher Dosierung IL-12 NOD-Mäusen systemisch appliziert wird, kann es den Krankheitsbeginn entweder beschleunigen [141] oder hinauszögern [142]. Interessanterweise hat der *IL-12 p40* Anteil allein nicht die gleiche Wirkung sondern antagonisiert IL-12 p70 [225]. Es wurde beschrieben, daß IL-12 p40 in der Lage ist, in NOD-Mäusen den Krankheitsbeginn des Diabetes zu verzögern [210, 211]. *TNF- $\alpha$*  wirkt synergistisch mit IL-12 auf die Th1/Th2-Balance des Immunsystems [80] fördert also, wie dieses, die Produktion von IFN- $\gamma$ .

Es handelt sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das sowohl bei Colitis als auch bei destruktiver Insulitis vermehrt auftritt [226, 26, 48].

Weiterhin wird vermutet, daß *TNF- $\alpha$*  über NO-Induktion direkt  $\beta$ -Zellentoxisch wirkt [82, 81] und somit die Entstehung eines Diabetes Mellitus beschleunigen kann. Andererseits werden transgene NOD Mäuse, die *TNF- $\alpha$*  in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimieren, vor Diabetes geschützt, obwohl eine Insulitis auftritt [167]. Auch die systemische Gabe von *TNF- $\alpha$*  scheint vor Typ 1 Diabetes bei NOD-Mäusen zu schützen [165, 166], je nachdem, in welchem Alter sie behandelt werden.

### 3 Blei

Schwermetalle wie Blei und Quecksilber sowie deren Verbindungen sind bereits seit langem als Umweltgifte bekannt. Besonders in industriellen Betrieben sind die Arbeiter oft Bleikonzentrationen ausgesetzt, die international festgelegte Grenzwerte überschreiten [39]. Daher zählen Bleivergiftungen immer noch zu den häufig auftretenden gewerblichen Erkrankungen [39]. Obwohl Anstrengun-

gen unternommen werden, die Bleiexposition des Menschen zu vermindern, z.B. durch bleifreie Kraftstoffe, bleifreie Wasserrohre und strengere Kontrollen der Industrieabwässer und Abgase, ist der Kontakt mit der Noxe nicht vermeidbar.

Blei und andere Schwermetalle kommen ubiquitär vor, weshalb sich die Aufnahme in den Körper, die hauptsächlich über Resorption im Gastrointestinaltrakt erfolgt [40], schwer kontrollieren läßt.

Vergiftungen mit Blei und auch anderen Schwermetallen, wie z.B. Quecksilber und Cadmium, rufen bei Menschen meist chronische Störungen hervor, können aber auch durch akute symptomatische Episoden gekennzeichnet sein [41].

Ab einer Blutbleikonzentration von etwa 40-50  $\mu\text{g}/\text{dl}$  besteht beim Kind ein hohes Risiko bleibender kognitiver Schäden. Symptome der akuten Enzephalopathie treten meist als Folge eines Hirnödems auf. Anfallsleiden, Verhaltensstörungen und Entwicklungsregression sind oft Zeichen einer chronischen Intoxikation.

Beim Erwachsenen steigt ab einer Blutbleikonzentration von über 60-70  $\mu\text{g}/\text{dl}$  das Risiko von Symptomen wie Persönlichkeitsveränderungen, Kopfschmerzen, Anorexie und unklaren abdominellen Beschwerden. Häufig sind auch hypochrome, mikrozytäre Anämien und Glomerulonephritiden [41].

### 3.1 Immunmodulatorische Wirkung von Blei

Blei wurde von Heo et al. 1996 und 1998 [42, 43] als potenter Immunmodulator beschrieben. Tierexperimente zeigten, daß es sowohl eine Suppression als auch eine Potenzierung bestimmter Immunreaktionen hervorrufen kann.

In Experimenten an verschiedenen Mausstämmen wurde eine verstärkte Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen beschrieben [44, 45], die sowohl durch direkte Aktivierung der B-Zellen als auch durch die Beeinflussung der Produktion bestimmter Zytokine ausgelöst wurde [46]. Bei diesen Mausstämmen verstärkte Blei hauptsächlich die Th2 Antwort auf Antigene, während eine Th1 Antwort vermindert wurde.

Die Bleieffekte setzten anscheinend mehr bei der Zelldifferenzierung an als bei der Proliferation [47]. Die Zelldifferenzierung, speziell von T-Helfer-Zellen, kann anhand des Zytokinmusters beurteilt werden.

Blei führt, wie beschrieben, zu einer Verschiebung des natürlichen Gleichgewichtes zwischen den von Th1 und Th2 Zellen gebildeten Zytokinen. Weil Th1 Zellen bei Typ 1 Diabetes der vorherrschende Zelltyp zu sein scheinen [6], ist es denkbar, daß Immunmodulationen im Sinne einer Verschiebung der Zytokinbalance, die durch Blei ausgelöst werden, die Entstehung des Typ 1 Diabetes bzw. dessen Progression bei NOD-Mäusen beeinflussen. Auch auf die Induktion einer oralen Toleranz könnte Blei auf diese Weise Auswirkungen haben.

## 4 Darmimmunsystem

Der Darm ist ein Organ, das auf Verschiebungen im Th1/Th2 Gleichgewicht empfindlich reagiert. Es wurde beschrieben, daß ein Mangel an IL-10 oder TGF- $\beta$  bzw. ein Überschuß an IFN- $\gamma$  zu fulminanten Enteritiden führt aber auch Nahrungsmittelallergien und andere Autoimmunkrankheiten hervorrufen kann [48, 49, 50].

Es ist anzunehmen, daß sowohl Blei als auch andere Schwermetalle, wie z.B. Quecksilber, ihre pathophysiologischen Effekte teilweise über eine Störung des Darmimmunsystems vermitteln. Ob und wie jedoch die durch Blei auslösbaren Immunmodulationen Autoimmunkrankheiten wie z.B. auch Typ 1 Diabetes zur Folge haben, ist bisher noch nicht untersucht.

## 4.1 Darmimmunsystem und Diabetes

Verschiedene Studien an NOD-Mäusen und BB-Ratten, die für das Auftreten autoimmunologisch hervorgerufenen Typ 1 Diabetes prädisponiert sind, haben gezeigt, daß Nahrungsmittelantigene und das Darmimmunsystem in der Diabetesentwicklung eine entscheidende Rolle spielen [51]. So war die Diabetesinzidenz bei solchen Tieren am höchsten, deren Nahrung hauptsächlich aus pflanzlichen Anteilen bestand [182, 183], wobei anscheinend Weizen und Sojaproteine eine besonders wichtige Rolle spielen [184, 185].

Im weiteren wurde bei Patienten mit neu aufgetretenem Typ 1 Diabetes eine gesteigerte Reaktivität des Immunsystems gegen Nahrungsmittelantigene beschrieben [52].

## 4.2 Orale Toleranz

Zum erstenmal wurde die orale Toleranz 1911 von Wells beschrieben [53]. Er beobachtete, daß man bei einer bestimmten Taubenart anaphylaktische Reaktionen gegenüber Hühnereiweiß vermeiden konnte, indem man sie mit Hühnereiproteinen fütterte.

Orale Toleranz beschreibt die Fähigkeit des Darmimmunsystems, nach oraler Gabe eines Antigens lokale und systemische hypersensitive Reaktionen des Körpers bei erneutem Kontakt mit dem Antigen zu unterdrücken. Dies sind z.B. Nahrungsantigene und die im Darm physiologisch vorkommenden Bakterien. Sie trägt somit z.B. dazu bei, allergische Reaktionen auf Nahrungsmittel sowie andere immunologisch vermittelte Krankheiten zu vermeiden.

Bei den hierzu führenden Mechanismen unterscheidet man klonale Deletion [198, 190] oder Anergie [56, 57] und aktive Suppression [60, 198, 218, 55, 54]. Meist führt die Zufuhr von hochdosiertem Antigen zur T-Zellen Deletion oder Anergie [198]. Hiervon sind hauptsächlich Th1 Zellen betroffen. Während Deletion durch Apoptose von T-Zellen zustande kommt [198] bezeichnet man einen Zustand als Anergie, in dem T-Lymphozyten auf einen Antigenreiz hin nicht verstärkt proliferieren und eine Immunantwort ausbleibt [212]. Die Zufuhr von niedrigen Dosen hat eine aktive zytokinmedierte Suppression der Immunantwort mit Prädominanz der von Th2- und Th3-Zellen gebildeten Zytokine zur Folge [218, 219, 60, 58, 59]. Als besonders wichtig gelten IL-10 und TGF- $\beta$  für die aktive Suppression [60] und wurden deshalb in dieser Arbeit untersucht.

OVA (Ovalbumin) wurde vielfach als potenter Induktor der oralen Toleranz beschrieben und wird häufig verwendet, um bei Versuchstieren diese immunologische Toleranz zu induzieren [59, 61].

Die Regulationsmechanismen beschränken sich nicht auf den Darm sondern kommen auch in der Peripherie vor. T-Zellen Rezirkulation spielt hierbei wahrscheinlich eine Rolle. Dies zeigten Lundin et al. [62] in einem Experiment mit für OVA toleranten Ratten. Bei diesen Tieren war die Menge der TGF- $\beta$  produzierenden T-Zellen in peripheren Lymphknoten nach Restimulation wesentlich

höher als bei nicht toleranten Tieren. Dies zeigt, daß TGF- $\beta$  auch in der Peripherie eine wichtige Rolle für die Unterhaltung der oralen Toleranz zu spielen scheint.

#### 4.2.1 „Bystander Suppression“ und deren Bedeutung für die Therapie von Autoimmunkrankheiten

Durch die Induktion regulatorischer Zellen mittels eines oral zugeführten Antigens können Immunreaktionen auf unterschiedliche Antigene unterdrückt werden, sofern das verwendete Antigen an dem betreffenden Ort eine Immunreaktion ausgelöst hat. Die durch das oral zugeführte Antigen angeregten regulatorischen Zellen sezernieren nach erneutem Kontakt mit diesem unspezifische Zytokine. Sie wirken in der Umgebung, in der das oral zugeführte Antigen lokalisiert ist [63, 64, 65, 66, 67, 68]. Man muß also, um immunologische Toleranz für ein spezielles Antigen in einem bestimmten Organ hervorzurufen, dieses nicht unbedingt kennen. Es genügt, wenn man mit Hilfe eines anderen Antigens im Zielorgan die gewünschte Immunreaktion hervorrufen kann. Dieses Phänomen wird als „Bystander Suppression“ bezeichnet [61].

TGF- $\beta$  scheint eines der Zytokine zu sein, die in diesem Zusammenhang die wichtigste Rolle spielen [63].

Bei der Multiplen Sklerose z.B. liegt autoimmune Reaktivität gegen mindestens drei verschiedene Myelinantigene vor [69, 70]. Versuche, zur Verbesserung des Krankheitsverlaufes Toleranz für eines dieser Antigene zu erzeugen, waren teilweise erfolgreich [72, 71, 214].

In bezug auf die Therapie von Autoimmunkrankheiten könnte daher die orale Toleranz in Zukunft möglicherweise eine Rolle spielen. Auch zur derartigen Therapie der rheumatoiden Arthritis beim Menschen [73, 215, 216] und des Diabetes bei NOD-Mäusen wurden bereits Versuche unternommen [220, 74]. In einer Studie zur rheumatoiden Arthritis beim Menschen sahen Trentham et al [73] und Barnett et al [216] teilweise eine Verbesserung der Symptome durch Gabe von Hühnerkollagen Typ II. Eine Studie in der Rinderkollagen Typ II eingesetzt wurde [234], zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Placebogruppe und behandelten Patientengruppen. In einer Studie von Choy et al [?], bei der die Patienten Rinderkollagen Typ II in verschiedenen Dosen über sechs Monate hinweg einnahmen, zeigte sich jedoch bei der Patientengruppe, die 0,5mg/d erhielt, eine signifikante Verbesserung der rheumatoiden Arthritis. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich durch ein enges therapeutisches Fenster der eingesetzten Dosis zu erklären, sowie durch die in den Studien eingesetzten unterschiedlichen Darreichungsformen des Kollagens [?]. Es sind also noch weitere Untersuchungen notwendig, um die eingesetzte Dosis und die Kollagenzubereitung zu optimieren.

Zur Diabetestherapie wurden mit über einen längeren Zeitraum oral zugeführtem Insulin Untersuchungen durchgeführt. Bis zu einem bestimmten Grade führte dies zu einem Hinauszögern des IDDM bei NOD-Mäusen und zur Verminderung der Insulinitis [74]. Beim Menschen gab es bisher noch keinen durchschlagenden Erfolg eines solchen Therapieansatzes. Lediglich Coutant et al [213] beschrieb 1998 bei Patienten mit neu diagnostiziertem Diabetes nach oraler Insulintherapie eine verbesserte  $\beta$ -Zellen Funktion und reduzierte Antiinsulinantikörper.

#### 4.2.2 Verlauf und Modulation der oralen Toleranz

Ca. 6 Stunden nach Toleranzinduktion mit OVA können Zytokinveränderungen im Darm nachgewiesen werden [75]. Die Induktion der oralen Toleranz ist altersabhängig. Anhand des Anti-OVA-Antikörpermusters stellten De Faria et al., 1998 [76] fest, daß in manchen Mausstämmen bei jungen Mäusen mit nur einer einzigen OVA-Gabe Toleranz ausgelöst wurde. Je älter die Mäuse waren, desto schwieriger wurde es, diese Reaktion des Immunsystems auszulösen.

Nicht nur das Zytokinmuster wird in Richtung Th2/Th3 verschoben, sondern es kommt auch zu Veränderungen in der Antikörperbildung. Kim et al. 1995 [77] zeigten in einem Experiment mit BALB/c und C3H/HeN Mäusen einen Abfall der Anti-OVA IgG nach Induktion der oralen Toleranz mit diesem Protein und anschließender Immunisierung.

Zusammengefaßt bedeutet dies, daß alle Faktoren, die Th1 Reaktionen fördern, wie verschiedene Infektionen und Autoimmunkrankheiten, auch Typ 1 Diabetes Mellitus, zu einer Abschwächung der oralen Toleranz führen müßten. Andere Einflüsse, die eine Th2/Th3-Reaktion des Immunsystems provozieren, z.B. einige bakterielle oder virale Infektionen, müßten hingegen zu einer Verstärkung der oralen Toleranz führen. Dies bestätigten z. B. Slavin et al. 1998 und Marth et al. 1996 [221, 222].

## 5 Fragestellung

Da die Zelldifferenzierung, speziell von T-Helfer-Zellen anhand des Zytokinmusters gut beurteilt werden kann, wurden für diese Arbeit mittels RT-PCR und ELISA Messungen an Zytokinen in verschiedenen Geweben durchgeführt. Da Bleieffekte anscheinend mehr bei der Zelldifferenzierung als bei der Proliferation ansetzen [47] ist dies sinnvoll. Hierdurch sollten Rückschlüsse auf altersabhängige und experimentell induzierte Veränderungen des Immunsystems ermöglicht werden.

Da im Mausmodell altersabhängige Veränderungen der Zytokinproduktion in Zusammenhang mit dem Auftreten von Autoimmunkrankheiten stehen, wurde der natürliche Verlauf der Zytokinexpression auf der Stufe der mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR im Rahmen einer Verlaufstudie im Darmgewebe von 5, 10 und 14 Wochen alten und frisch diabetischen NOD-Mäusen ermittelt. Um Unterschiede zu Individuen, die nicht für eine Autoimmunkrankheit prädisponiert sind zu erkennen, wurde parallel die Zytokinexpression im Darmgewebe von C57BL/6-Mäusen analysiert.

Im weiteren wurde untersucht, wie das Immunsystem von NOD-Mäusen auf Modulatoren reagiert und in wie weit sich diese Reaktionen von denen bei C57BL/6-Mäusen auf Zytokinebene unterscheiden.

Hierzu wurde zunächst unter physiologischen Bedingungen in Tieren beider Mausstämme orale Toleranz gegen OVA induziert und die Zytokinexpression im Darm sowie die systemische Antikörperproduktion analysiert, um mögliche Unterschiede zwischen den Mausstämmen zu erkennen. Um orale Toleranz nachzuweisen wurde TGF- $\beta$  im Darmgewebe gemessen, bzw. die Proliferationsrate in lymphatischen Organen beurteilt.

In weiteren Experimenten wurde zusätzlich die Umwelttoxine Blei eingesetzt, um zu testen, ob Immunmodulationen, wie sie von Warner und Lawrence [44]

und McCabe und Lawrence [45] an verschiedenen Mausstämmen beobachtet wurden, auch bei NOD-Mäusen auslösbar sind, und ob sie sich wegen der immunologischen Besonderheiten dieser Tiere von denen anderer Mausstämme unterscheiden. Der Einfluß von  $\text{PbCl}_2$  auf die Induktion der oralen Toleranz als Charakteristikum des Darmimmunsystems wurde dazu im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen analysiert.

In diesem Rahmen soll auch die These geprüft werden, ob Faktoren, die eine Th1 Reaktion des Immunsystems fördern, zu einer Abschwächung der oralen Toleranz führen und andererseits eine verstärkte Th2/Th3 Reaktion auch zu einer stärkeren Ausprägung der oralen Toleranz.

Darüber hinaus wurden in für Typ 1 Diabetes prädisponierten NOD-Mäusen subkutane (s.c.) und orale Applikationsformen von  $\text{PbCl}_2$  verglichen. Zuletzt wurden die  $\text{PbCl}_2$ -Effekte bei NOD-Mäusen unabhängig von der oralen Toleranz untersucht.

## Teil II

# MATERIAL UND METHODEN

## 6 Material

### 6.1 Versuchstiere (Mäuse)

NOD-Maus: Tiermodell für den IDDM. MHC-Haplotyp H-2<sup>g7</sup>(K<sup>d</sup>, I-A<sup>g7</sup>, I-E<sup>null</sup>, D<sup>b</sup>)

1. Für die Versuche zum altersabhängigen Verlauf der Darmzytokinexpression: von Møllegaard und Bomholdgård, Ry, Dänemark, ab der 5. Lebenswoche für experimentelle Zwecke verwendet.
2. Für die Versuche zur oralen Toleranz in Verbindung mit subkutaner Bleichloridbehandlung: 1983 von der Universität von Ehime Japan erhalten und als Inzuchtstamm an der Universität Auckland, Neuseeland, vermehrt. Sie erhielten Futter aus lokalem Anbau. (Diet 86, New Zealand Stockfoods, Auckland, New Zealand) und Wasser ad libitum. Zu Beginn der Experimente waren die Mäuse 6 Wochen alt.
3. Für die Versuche zur oralen Toleranz in Verbindung mit oraler Bleichloridbehandlung: von Møllegaard und Bomholdgård, Ry, Dänemark. Diese erhielten Standardfutter (ssniff M-Z, Sniff, Soest) und deionisiertes Wasser ad libitum. Ab einem Alter von 9 Wochen wurden sie für experimentelle Zwecke verwendet.

C57BL/6: Inzuchtstamm mit dem MHC- Haplotyp H-2<sup>b</sup> (K<sup>b</sup>, I-A<sup>b</sup>, I-E<sup>null</sup>, D<sup>b</sup>) von M&B (Møllegaard & Bomholtgård) ab einem Alter von 5 Wochen für experimentelle Zwecke verwendet.

### 6.2 Geräte

Die im folgenden aufgeführten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Substanzen stammten von den Firmen Advanced Biotechnologies (Surrey, England); AGS (Heidelberg, Deutschland); Amefa (Kriftel, Deutschland); Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland); Beckman (Palo Alto, CA, USA); Becton Dickinson (San Jose, CA, USA); Bio Photonics Rodenstock GmbH (München, Deutschland); Boehringer GmbH (Mannheim, Deutschland); Brand (Wertheim, Deutschland); Dianova-Immunotech GmbH (Hamburg, Deutschland); Dunn (Asbach, Deutschland); Eppendorf (Hamburg, Deutschland); Eugene (Pitchford, AVE, USA); FAG (Linkenheim-Hochstetten); Falcon BD Biosciences (Bedford, MA, USA); Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland); Fluka (Buchs, Schweiz); Fuji Photo Film Co. (Japan); Gibco (Heidelberg, Deutschland); Gillson (Villiersle-Bel, Frankreich); Greiner (Solingen, Deutschland); Heidolph (Kelheim, Deutschland); Heraeus (Düsseldorf, Deutschland); ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland); IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland); Invitrogen (NV Leek, Niederlande); Janke&Kunkel (Staufen, Deutschland); Knick (Berlin, Deutschland);

Kontron Instruments (Mailand, Italien); Life-Technologies (Eggenstein, Deutschland); Macherey-Hagel GmbH & Co. (Düren, Deutschland); Menzel (Braunschweig, Deutschland); Merck (Darmstadt, Deutschland); Millipore (Molsheim, Frankreich); Milteny Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland); Molecular Devices (Graefeling, Deutschland); MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland); NEB New England Biolabs (Missisauga, ONT, Canada); Nunc (Roskilde, Dänemark); Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA); PharMingen (Hamburg, Deutschland); Promega (Madison, WI, USA); Roth (Karlsruhe, Deutschland); Sartorius (Göttingen, Deutschland); Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland); Savant Instruments (Farmingdale, NY, USA); Serva (Heidelberg; Deutschland); Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland); Sony (Japan); Stratagene (Heidelberg, Deutschland); T.T.T. Filmservice (Heilbronn, Deutschland); Vilber-Lourmat (Marne la Valee, Frankreich); Zinsser (Frankfurt, Deutschland); Zymed (San Francisco, USA)

Analysenwaage A 200 S: Sartorius  
Beta-Counter R300: Kontron  
Biogel P60 Säule: Stratagene  
Brutschrank Cytoperm: Heraeus  
DNA Thermocycler Gene Amp PCR System9600: Perkin Elmer  
DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer  
Elektrophorese-Kammern: Gibco und Advanced Biotechnologies  
ELISA-Reader und Software (SOFT-max): MWG  
FACScan Flow Cytometer: Becton Dickinson  
Fuji Imaging Plate Type BAS-III S: Fuji  
Geigerzähler Contamat: FAG  
Gewebezerkleinerer Ultra-Turrax T25: IKA  
Grobwaage BP610: Sartorius  
Labor-pH-Meter Typ 647: Knick  
Lumi-Imager mit LumiAnalyst 3.0: Boehringer  
VarioMACS: Milteny Biotec  
Magnetrührer mit Heizplatte: Janke & Kunkel  
Monitor Black and White SSM-930 CE: Sony  
Neubauer-Zählkammer (verbessert): Brand  
Pipetten: Gillson und Eppendorf  
Powersupply PPS 200-1D: MWG  
Schüttler Titramax 100 für Mikrotiterplatten: Heidolph  
Spektralphotometer DU 650: Beckman  
Sterilbank LaminAir HLB 2472: Heraeus  
UV-Strahlen-Leuchttisch: Vilber-Lourmat  
UV Stratalinker 2400: Stratagene  
Vakuumpzentrifuge DNA Speed Vac DNA 100: Savant  
Videokamera Gel Print 1000i: Bio Photonics  
Video Graphic Printer LIP-890CE: Sony  
Vielkanal-Zellertegerät Titertek: Flow Laboratories  
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q UF plus: Millipore  
Zentrifuge GS-15 R: Beckman  
Zentrifuge Omnifuge 2QRS: Heraeus  
Zentrifuge 5415C: Eppendorf

### 6.3 Verbrauchsmaterial

Deckgläser: Menzel, Braunschweig  
ELISA-Mikrotiterplatten PRO-BIND: Becton Dickinson  
FACS-Röhrchen: Falcon, Becton Dickinson,  
Filterpapier für Zellerntegerät: Dunn  
Kammerobjektträger Lab-Tech: Nunc  
Kanülen Microlance 3 (23G): Becton Dickinson  
Platten: Becton Dickinson  
Mikrotiterplatten: Becton Dickinson und Greiner  
Nylonmembran Hybond N+ 20 cm · 3 m: Amersham Buchler  
PCR-Platten ThermPCo-Fast 96: Advanced Biotechnologies  
Pipettenspitzen: Gilson und Sarstedt  
Polaroid Film 667: T.T.T. Filmservice  
Polypropylen-Röhrchen: Becton Dickinson und Greiner,  
Reaktionsgefäße: Eppendorf und Sarstedt  
Spritzen: Amefa  
Sterilfilter Sterivex-GV 0,22  $\mu$ m: Millipore  
Sterilsieb 125  $\mu$ m: Falcon, Becton Dickinson

### 6.4 Substanzen

ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Zymed  
Agarose Qualex Gold: AGS  
(Alpha-<sup>32</sup>P) dATP a 250  $\mu$ Ci: ICN Biomedicals  
Ampicillin: Sigma-Aldrich  
Antikörper Rabbit anti Mouse IgG, IgG1, IgG2a: Zymed  
Anti-Maus-Thy1.2: Boehringer  
Avidin-Peroxidase: Dianova-Immunotech  
Bleichlorid (PbCl<sub>2</sub>): Fluka  
Bromphenolblau: Serva  
BSA (Bovine Serum Albumin): Sigma  
DEPC: Sigma  
100 bp DNA Ladder: Gibco  
DTT: Gibco  
EDTA (Natriumsalz): Sigma-Aldrich  
Enzyme (Fok I, Mae III, MSE I, BstE II, Sma I, Mbo I): NEB  
Ethidiumbromid: Serva  
FBS (Fetal Bovine Serum F7524): Sigma  
Fluoreszenzfarbstoffe: Eugene  
    FITC (Fluorescein-Isothiocyanat; grün)  
    PE (Phycoerythrin; rot)  
    PJ (Propidiumjodid; orange)  
Gene Amp-Kit: Perkin Elmer  
    Magnesiumchlorid  
    PCR-Puffer II  
    dNTP  
    RNase Inhibitor  
    MuLV-Rtase  
    Oligo d(T)<sub>16</sub>

AmpliTaq-DNA-Polymerase  
 Glycerin: ICN  
 B220 Microbeads: Milteny Biotec  
 Mineralöl, light white oil: Sigma  
 Nucleo Spin Extract Kit: Macherey-Hagel  
 OptEIA Sets für IL-10 und IFN- $\gamma$ : PharMingen  
 OVA (Ovalbumin, Grade V): Sigma  
 Prime it II Random Labeling Kit: Stratagene  
     Klenow-Enzym  
     Random Primer  
     Stop Mix  
 Streptavidin HRP-Konjugat: Zymed  
 Szintillationsflüssigkeit Quickszint 212: Zinsser  
 TaqDNA Polymerase: Gibco/Life-Technologies  
 TGF- $\beta$  Emax Immunoassay System: Promega  
 TMB-Substratreagent Set: PharMingen  
 TOPO-TA Cloning Kit: Invitrogen  
 Tri Reagent: Sigma  
 Tris: Roth  
 [3H]-Thymidin: Amersham  
 Xylencyanol FF: Serva  
 Zitrat: Roth  
 Wasser: Reagenzwasser, reinst, Widerstand  $\geq 18,2\text{M}\Omega$  cm, selbst  
 hergestellt mit dem Milli-Q UF plus Wasseraufbereitungssystem von  
 Millipore  
 Alle weiteren Reagenzien für RT und PCR wurden von Perkin-Elmer,  
 Promega und Gibco/Life-Technologies bezogen.  
 Alle hier nicht im einzelnen aufgelisteten Reagenzien wurden von Merck  
 und Sigma bezogen.

## 6.5 Medium und Reagenzien für Zellkultur

RPMI 1640: Gibco

FBS,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Penicillin G, Streptomycin, CFA, L-Glutamin:  
Sigma

## 6.6 Puffer und Lösungen

### 6.6.1 Zellkultur

#### PBS (10 $\times$ )

1,37 M NaCl	80,06 g/l
27 mM KCl	2,01 g/l
65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	11, 57 g/l
15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,04 g/l

Reagenzien separat in Wasser lösen, Lösungen mischen und pH auf 7,2 einstellen; Lagerung bei -20°C; bei Bedarf verdünnen, pH erneut auf den gewünschten Wert einstellen. Für Zellkultur steril-filtrieren.



### **TGF- $\beta$ -Waschpuffer**

20 mM Tris-HCL	2,423 g
150 mM NaCl	8,775 g

Wasser ad 1 l, pH auf 7,6 einstellen, 0,05% (v/v) Tween 20 zugeben.

### **TMB-Substratlösung**

Mischung von Substrat-Reagenz A (enthält Wasserstoffperoxid) und Substrat-Reagenz B (enthält TMB in organischem Lösungsmittel) zu gleichen Volumina; immer frisch ansetzen.

### **6.6.3 RT-PCR und Southern Blot**

#### **Alkaline-Lysis Puffer**

0,4 M NaOH	75 $\mu$ l
2% SDS	75 $\mu$ l

Mit NaOH auf pH 10,0 einstellen.

#### **Church-Buffer**

1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	125 ml
0,5 M EDTA	1 ml
20 % SDS	175 ml

#### **Denaturierungspuffer (2 $\times$ )**

1 M NaOH	120 g
3 M NaCl	525,6 g

Ad 3 l Wasser.

#### **DEPC-Ethanol**

75 % DEPC-Wasser  
25 % Ethanol abs.  
Lagerung bei -20°C.

#### **DEPC-Wasser**

0.1% DEPC in Wasser geben und schütteln, über Nacht auf einem Magnetrührer unter dem Abzug rühren, autoklavieren und alliquotieren; Lagerung bei 20°C.

#### **DNA-Probenpuffer**

0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol  
30 % Glycerin  
in DEPC-Wasser.

### 100 Basenpaar-DNA-Leiter

100 bp DNA-Ladder	50 $\mu$ l
TE-Puffer	1950 $\mu$ l
DNA-Probenpuffer	400 $\mu$ l

Lagerung bei 4°C.

### LB-Medium

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g

Zur Herstellung der LB Platte wurde 15 g Agar für 1 l LB Medium verwendet.

### Neutralisations Lösung

Aqua ad injeatbilia	4,5 ml
3 M Nate pH 4,9	2,25 ml
5 M NaCl	0,75 ml

### Neutralisierungspuffer

5 M NaCl	60 ml
1,25 M Tris/HCl	40 ml

### SOC-Medium

Bacto-Trypton	2%
Yeast Extract	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
Glukose	20 mM

### SSC (20×)

NaCl	175,3 g
Natriumcitrat	88,2 g

In 800 ml Wasser lösen, mit 10 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, ad 1 l Wasser.

### STE

NaCl	0,1 M
Tris Cl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

### TBE (5×)

500 mM Tris	60,55 g/l
430 mM Borsäure	26,70 g/l
10 mM EDTA	3,72 g/l

Lagerung bei 20°C, bei Bedarf mit Wasser verdünnen.

## TE

10 mM Tris	1,21 g
1 mM EDTA	0,38 g

Wasser ad 1 l, pH auf 8,0 einstellen.

## Waschpuffer zum Hybridisieren

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40 mM
SDS	1%

## 6.7 Oligonukleotide für die RT-PCR

Sequenzen der DNA-Oligonukleotide (5' → 3'; Life Technologies)

### *β*-Aktin:

5': CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG

3': TCA TAG ATG GGC ACA GTG TG

Fragmentlänge der amplifizierten cDNA 166 bp [125].

### IFN- $\gamma$ :

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

3': TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA AAC TTG GC

Fragmentlänge 365 bp [126].

### IL-10:

5': TCC TTA ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG

3': GAC ACC TTG GTC TTG GAG CTT ATT AAA ATC

Fragmentlänge 258 bp [127].

### TGF- $\beta$ :

5': TGG ACC GCA ACA ACG CCA TCT ATG AGA AAA CC

3': TGG AGC TGA AGC AAT AGT TGG TAT CCA GGG CT

Fragmentlänge 525 bp [128].

### IL-12 p40

5': GAC CCT GCC CAT TGA ACT GGC

3': CAA CGT TGC ATC CTA GGA TCG

Fragmentlänge 415 bp [129].

### TNF- $\alpha$

5': TTC TGT CTA CTG AAC TTC GGG GTG ATC GGT CC

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

Fragmentlänge 354 bp [130].

## 7 Methoden

### 7.1 Behandlung und Präparation der Tiere

**Für die Versuche zum altersabhängigen Verlauf der Darmzytokinexpression** (1. Versuchsreihe): Die NOD- und C57BL/6-Mäuse blieben unbehandelt. Im Alter von 5, 10 und 14 Wochen wurden je 6 Tiere getötet, bei den NOD-Mäusen zusätzlich 9 Tiere unmittelbar nach Einsetzen der Diabetes-symptomatik im Alter von 14-16 Wochen. Unter sterilen Bedingungen wurde allen Tieren Blut, Pankreas und der vollständige Darm entnommen. Die Därme wurden mit PBS gründlich gespült und anschließend die Payerschen Plaques vollständig entfernt. 10-12 cm lange Dünndarmstücke wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Für die Versuche zur oralen Toleranz in Verbindung mit subkutaner Bleichloridbehandlung** (2. Versuchsreihe): Über zwei Wochen hinweg erhielten die NOD- bzw. C57BL/6-Mäuse am 1., 3., 6., 8., 10. und 13. Tag je eine Injektion von  $10\ \mu\text{g}$   $\text{PbCl}_2$  in  $100\ \mu\text{l}$  NaCl-Lösung ( $0,5\ \text{mg/kgKG}$ ) in den Schwanzansatz. Eine zweite Gruppe erhielt in der gleichen Zeit Injektionen des entsprechenden Volumens NaCl-Lösung ohne weitere Zusätze. Den Tieren beider Gruppen wurde am 8., 10. und 13. Behandlungstag je  $5\ \text{mg}$  OVA in  $100\ \mu\text{l}$  NaCl-Lösung oral zugeführt. Eine dritte Gruppe Tiere blieb unbehandelt.

Zwei Tage nach der letzten OVA-Gabe wurden alle NOD-Mäuse mit einer s.c. Injektion von  $50\ \mu\text{g}$  OVA in  $50\ \mu\text{l}$  NaCl-Lösung und  $50\ \mu\text{l}$  CFA in den Schwanzansatz immunisiert. 10 Tage nach der letzten Behandlung (C57BL/6) bzw. 8 Tage nach der Immunisierung mit OVA (NOD) wurden die Tiere getötet.

Unter sterilen Bedingungen wurde ihnen der Dünndarm komplett entnommen, mit PBS gespült, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Den NOD-Mäusen wurden zusätzlich die Milzen entnommen.

Die Bleidosis wurde so gewählt, daß mindestens die Blutbleikonzentration, die beim erwachsenen Menschen zu Symptomen führt ( $60-70\ \mu\text{g/dl}$  Blut [41], dies entspricht etwa  $0,05\ \text{mg/kgKG}$ ) erreicht werden konnte. Bei der verwendeten Bleidosis kann man davon ausgehen, daß nach Resorption und Verteilung des  $\text{PbCl}_2$  auf die verschiedenen Kompartimente etwa diese Konzentration erreicht ist.

**Für die Versuche zur oralen Toleranz in Verbindung mit oraler Bleichloridbehandlung** (3. Versuchsreihe): Am 2., 4., 6., 8. und 10. Behandlungstag erhielten die Mäuse je eine orale Gabe  $100\ \mu\text{l}$   $10\ \text{mM}$   $\text{PbCl}_2$  in Trinkwasser. Tiere der Vergleichsgruppe erhielten das gleiche Volumen Trinkwasser ohne Zusätze. Am 1., 3., 5., 7. und 9. Behandlungstag wurde je eine orale Gabe  $1\ \text{mg}$  OVA in  $250\ \mu\text{l}$  PBS appliziert. Eine unbehandelte Kontrollgruppe erhielt entsprechende Volumina PBS ohne Zusätze. Eine vierte Gruppe wurde nur mit  $\text{PbCl}_2$  behandelt, bekam aber kein OVA. Zwei Tage nach der letzten OVA-Gabe wurden die Mäuse mit einer s.c. Injektion von  $50\ \mu\text{g}$  OVA in  $50\ \mu\text{l}$  NaCl-Lösung und  $50\ \mu\text{l}$  CFA in die linke hintere Fußsohle immunisiert.

Sieben Tage später wurden die Mäuse getötet. Unter sterilen Bedingungen wurden die Därme und die poplitealen Lymphknoten entnommen. Die Därme wurden mit PBS gründlich gespült und anschließend die Payerschen Plaques

vollständig entfernt. 10-12 cm lange Dünndarmstücke wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Unter Berücksichtigung, daß die Resorption des  $\text{PbCl}_2$  aus dem Darm deutlich geringer ist, als bei subkutaner Applikationsform, wurde hier eine deutlich höhere Bleidosis eingesetzt.

## **7.2 Semiquantitative Bestimmung der mRNA (RT-PCR)**

### **7.2.1 RNA-Isolation aus Gewebe**

Die RNA aus Darmgewebe und Payerschen Plaques wurde mit TRI Reagent (Sigma), einer Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, in Anlehnung an das Herstellerprotokoll isoliert. Je 100 mg Gewebe wurden in 1 ml TRI-Reagent 10 sek homogenisiert (IKA-Ultra-Turrax T25), anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform 15 sek bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Nach weiteren 3 min Inkubation wurde der Ansatz 15 min bei 12000g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und die RNA-haltige Oberphase vorsichtig von der DNA-haltigen Interphase und der proteinhaltigen Phase abpipettiert. In einem neuen Gefäß wurde die RNA-Phase mit 0,5 ml Isopropanol vermischt, gevortext und erneut 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente zur Ausfällung der gelösten RNA. Durch 10 min zentrifugieren bei 12000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde anschließend die RNA pelletiert, der Überstand vorsichtig möglichst vollständig entfernt und das Pellet mit 0,5 ml 75% DEPC-Ethanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) und Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die RNA bei Raumtemperatur in einer Vakuumzentrifuge ca. 5 min getrocknet. Die RNA wurde dann in 100-300 ml DEPC-Wasser aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren mit einer blauen Einmalpipettenspitze (100-1000  $\mu\text{l}$ ) gelöst.

Nach der spektralphotometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 10% DTT und 1% RNasin Ribonuklease Inhibitor (Promega) hinzugegeben und die RNA bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

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

Die RNA-Konzentration jeder Probe wurde spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion eines mit Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5) 1:50 bis 1:100 verdünnten Aliquots bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Bei 260 nm ( $E_{260}$ ) entspricht eine Extinktion von 1 etwa 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA.

Die Reinheit der RNA-Präparation wird aus dem Verhältnis der Extinktionen bei den Wellenlängen  $E_{260}/E_{280}$  bestimmt und sollte bei wäßrigen Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Durch Protein- oder Phenolbeimengungen, deren Eigenabsorption bei 280 nm stärker ist als die der Nukleinsäuren, wird dieser Reinheitswert deutlich vermindert.

### **7.2.3 Reverse Transkription**

Die in der isolierten Gesamt-RNA enthaltene mRNA wurde mit Reverser Transkriptase aus dem Murinen Leukämievirus (MuLV-RTase) und einem Oligo

d(T)16-Startprimer enzymatisch in cDNA umgeschrieben. Diese Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Nach Anlagerung des Startprimers an den Poly-A-Schwanz der mRNA synthetisiert sie einen komplementären DNA-Strang. Durch intrinsische RNase-Aktivität degradiert sie anschließend die RNA-Vorlage.

Zuerst wurden die RNA Proben so verdünnt, daß in 6  $\mu$ l DEPC Wasser 1  $\mu$ g RNA enthalten war. Bei 60° C wurde die RNA 90 sek denaturiert und auf Eis gegeben. Anschließend wurde zu jeder Probe 34  $\mu$ l RT-Mix hinzugefügt. Die Reagenzien hierfür stammten aus dem Gene-Amp-Kit von Perkin Elmer:

8  $\mu$ l Magnesiumchlorid (25 mM)  
4  $\mu$ l 10 $\times$ PCR-Puffer II  
4 $\times$ 4  $\mu$ l dNTPs (jeweils 5 mM)  
2  $\mu$ l RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)  
2  $\mu$ l MuLV-RTase (50 U/ $\mu$ l)  
2  $\mu$ l Oligo d(T)16 (50  $\mu$ M)

pro Reaktionsansatz.

Für die Reverse Transkription wurden die Ansätze 90 min bei 42°C und 5 min. bei 95°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 7.2.4 PCR

Durch mehrere Zyklen aus DNA-Denaturierung, Oligonukleatidanlagerung und DNA-Synthese wurden mit dieser Methode spezifische DNA-Sequenzen selektiv amplifiziert. Dies geschah mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase aus dem Eubakterium *Thermus Aquaticus*.

Um gegebenenfalls die Amplifikation genomischer DNA von der, der cDNA unterscheiden zu können wurden intronüberspannende Oligonukleotidsequenzen verwendet.

**7.2.4.1 PCR für die Versuche zum natürlichen Verlauf der Darmzytokinexpression und zur oralen Toleranz mit oraler Bleichloridbehandlung** Durch DNA Titration und Bestimmung der optimalen Zyklenzahl wurde sichergestellt, daß die Reaktion in der exponentiellen Phase der Zunahme der PCR-Produkte gestoppt wurde. Die optimale Zyklenzahl ist diejenige, bei der eine lineare Korrelation zwischen der Menge der PCR-Produkte und der eingesetzten cDNA-Menge vorliegt.

Um einen Vergleich von Meßwerten für verschiedene cDNA-Proben einer PCR-Reaktion durchführen zu können, wurde die Menge an PCR-Produkt für eine bestimmte mRNA durch die Menge des PCR-Produktes für das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Aktin in der selben cDNA-Probe dividiert. Dieses Vorgehen erlaubt es, semiquantitative Aussagen über die Expression bestimmter Gene zu machen.

Für eine PCR wurde so titriert, daß in vier Ansätzen à 5  $\mu$ l jeweils 3  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 0,33  $\mu$ l oder 0,11  $\mu$ l einer cDNA enthalten waren. Pro Ansatz wurden 20  $\mu$ l eines PCR-Mixes hinzugegeben. Die Reagenzien stammten aus dem Gene-Amp-Kit von Perkin Elmer. Je Ansatz:

2,5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR-Puffer II  
2,0  $\mu$ l Magnesiumchlorid (25 mM)  
2,5  $\mu$ l dNTP Mix (je 2,5 mM)

1,0  $\mu\text{l}$  Oligonukleotidmix (je 5  $\mu\text{M}$ )  
0,125  $\mu\text{l}$  AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )  
11,875  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser

Die PCR wurde in einem DNA-Thermocycler Gene Amp PCR System 9600 von Perkin Elmer nach folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung der cDNA: 2 min 94°C
2. variable Anzahl von PCR-Zyklen:  $\beta$ -Aktin: 21, IL-10: 39, TGF- $\beta$ : 34, IFN- $\gamma$ : 34, IL-12p40: 35, TNF- $\alpha$ : 20
  - Denaturierung neusynthetisierter cDNA: 30 sek, 94°C
  - Anlagerung der Oligonukleotide an die cDNA: 45 sek (Temperaturen spezifisch für die einzelnen Oligonukleotide:  $\beta$ -Aktin: 55°C, TGF- $\beta$ : 60°C, IL-10: 60°C, IFN- $\gamma$ : 60°C, IL-12: 60°C, TNF- $\alpha$ : 60°C)
  - Verlängerung der Oligonukleotide/DNA-Synthese: 45 sek ( $\beta$ -Aktin), sonst 1 min bei 72°C
3. Abschluß der DNA-Synthese: 7 min 72°C

Jede PCR einschließlich Negativkontrolle, der keine cDNA zugesetzt war, wurde zweimal durchgeführt. Die PCRs wurden bis zur Weiterverwendung in der Gelelektrophorese bei -20°C aufbewahrt.

**7.2.4.2 DNA-Elektrophorese** Jedem PCR Ansatz wurde 5  $\mu\text{l}$  DNA Probenpuffer zugefügt. Je 8  $\mu\text{l}$  dieser Mischung oder 2  $\mu\text{l}$  einer 100 bp DNA-Leiter in Probenpuffer wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt:

1,8 g Agarose  
12,0 ml 5 $\times$ TBE Puffer  
108 ml Wasser  
2,4  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid-Lösung 1% (w/v)

Dies entspricht 120 ml mit 96 Taschen.

Dem Laufpuffer (0,5 $\times$ TBE) wurde Ethidiumbromid in derselben Konzentration wie im Gel enthalten zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte 30-40 min bei 75 V.

**7.2.4.3 Quantifizierung der PCR-Produkte** Die PCR-Fragmente bekannter Länge bzw. der Längenstandard wurden über die Ethidiumbromid vermittelte Fluoreszenz der Banden identifiziert. Die Detektion erfolgte mit einem Lumi-Imager von Boehringer. Die zugehörige Software LumiAnalyst 3.0 erlaubt die Quantifizierung der Fluoreszenz der einzelnen Banden in BLU (Boehringer Light Units).

Für jede cDNA ergaben sich nun vier BLU Werte der Verdünnungsreihe. Diese korrelierten aufgrund der gewählten Zyklenzahl linear mit den eingesetzten cDNA Volumina.

Durch lineare Regression wurde die Gleichung der Regressionsgeraden (BLU in Abhängigkeit des in die PCR eingesetzten cDNA Volumens) und daraus der Wert  $BLU/\mu l$  bestimmt.

Mittels Division des  $BLU/\mu l$  Wertes eines bestimmten PCR-Fragmentes durch den  $BLU/\mu l$  Wert der zugehörigen  $\beta$ -Aktin PCR wurde der relative Wert für die Menge einer bestimmten mRNA errechnet und als arbitrary unit [a.u.] in den entsprechenden Graphen eingetragen.

### 7.2.5 PCR für die Versuche zur oralen Toleranz mit subkutaner Bleichloridbehandlung

Durch Bestimmung der optimalen Zyklenzahl für die einzelnen Zytokine wurde sichergestellt, daß die Reaktion in der exponentiellen Phase der Zunahme der PCR-Produkte gestoppt wurde.

Auch hier wurde, um einen Vergleich von Meßwerten für verschiedene cDNA-Proben einer PCR-Reaktion durchführen zu können, die Menge an PCR-Produkt für eine bestimmte mRNA durch die Menge des PCR-Produktes für das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Aktin in der selben cDNA-Probe dividiert, so daß semi-quantitative Aussagen über die Expression bestimmter Gene möglich waren. Für eine PCR wurden  $5 \mu l$  cDNA eingesetzt. Pro Ansatz wurden  $18,4 \mu l$  eines PCR-Mixes hinzugegeben. Die Reagenzien stammten von Promega:

- 2  $\mu l$  10 $\times$ PCR-Puffer II
- 0,625  $\mu l$  Magnesiumchlorid (25 mM)
- 0,25  $\mu l$  5'Primer
- 0,25  $\mu l$  3'Primer
- 15,275  $\mu l$  DEPC-Wasser

Auf jede Probe wurden  $80 \mu l$  Mineralöl gegeben, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Die Proben wurden im PCR-Block bei  $78^\circ C$  1 Minute erwärmt. Anschließend wurde jeder Probe  $1,6 \mu l$  eines Gemisches aus DEPC-Wasser und Taq-Polymerase ( $20 \mu l$  DEPC-Wasser +  $3 \mu l$  Taq-Polymerase) hinzugefügt. Dies geschah mit einer Pipette durch die Ölphase hindurch.

Die PCRs wurden in einem DNA Thermal Cycler 480 von Perkin Elmer Cetus nach folgendem Programm durchgeführt:

1. Denaturierung der cDNA: 3 min  $94^\circ C$
2. Variable Anzahl von PCR-Zyklen:  $\beta$ -Aktin: 26, IL-10: 40, TGF- $\beta$ : 32, IFN- $\gamma$ : 32
  - Denaturierung neusynthetisierter cDNA: 45 sek,  $94^\circ C$
  - Anlagerung der Oligonukleotide an die cDNA: 45 sek (Temperaturen spezifisch für die einzelnen Oligonukleotide:  $\beta$ -Aktin:  $55^\circ C$ , TGF- $\beta$ :  $60^\circ C$ , IL-10:  $60^\circ C$ , IFN- $\gamma$ :  $60^\circ C$ )
  - Verlängerung der Oligonukleotide/DNA-Synthese: 60 sek ( $\beta$ -Aktin), sonst 90 sek bei  $72^\circ C$
3. Abschluß der DNA-Synthese: 7 min  $72^\circ C$

Jede PCR wurde dreimal durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben im Kühlschrank bei  $4^\circ C$  aufbewahrt.

**7.2.5.1 Agarosegelelektrophorese** Je 10  $\mu\text{l}$  der PCR-Proben wurden unter dem Öl herauspipettiert und in Eppendorfgläsern mit je 2  $\mu\text{l}$  DNA Probenpuffer vermischt. 10  $\mu\text{l}$  dieser Mischungen oder 6  $\mu\text{l}$  einer 100bp DNA-Leiter in Probenpuffer wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt.:

0,5 g Agarose  
5,0 ml 5 $\times$ TBE Puffer  
45 ml VE-Wasser  
1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid-Lösung 1% (w/v)

Dies entspricht 50 ml Agarosegel mit 24 Taschen.

Als Laufpuffer ( 0,5 $\times$ TBE) wurde 0,5 $\times$ TBE-Puffer verwendet.

Die Auftrennung erfolgte 50 min bei 80 V.

Die qualitative Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe eines UV-Strahlen-Leuchttisches (Vilber-Lourmat). Die auf den Gelen befindlichen Banden leuchteten im UV-Licht auf. Die Ergebnisse wurden auf einen Spezialfilm fotografiert (Polaroid Film 667, T.T.T. Filmservice) bzw. mittels einer Videokamera mit angeschlossenem Drucker dokumentiert (Gel Print 1000i, Bio Photonics; Black and White Monitor SSM-930CE und Video Graphic Printer LIP-890CE, Sony).

**7.2.5.2 Blotten der Elektrophoresegele** Nach dem Fotografieren wurden die Markerlane und die Ränder des Gels abgetrennt und verworfen, so daß nur noch die Probenlanes übrig blieben. Die zugeschnittenen Gelstücke wurden zur Unterscheidung gekennzeichnet und in einer Wanne mit 1 $\times$ Denaturierungspuffer für 35 min inkubiert. Danach erfolgte 30 min Inkubation in Neutralisierungspuffer. Während dessen wurden vier Lagen Filterpapier und eine Nylonmembran (Hybond N+) im Ausmaß der Gele zurechtgeschnitten. Die Nylonmembran wurde dabei, um das Ergebnis nicht zu verfälschen, nur mit einer sauberen Pinzette angefaßt. Die Lagen wurden mit 10 $\times$  SSC angefeuchtet.

Der Aufbau der Blotts erfolgte auf einer glatten, waagerechten Oberfläche (Glasplatte). Auf zwei Lagen angefeuchteten Filterpapiers wurden die Gele mit den Slots nach unten ausgerichtet. Die Nylonmembranen wurden anschließend luftblasenfrei auf die Gele gelegt. Die Schichten wurden dann mit weiteren zwei Lagen Filterpapier abgedeckt. Ca. 20 bis 30 Lagen Saugpapier wurden auf die Blots gelegt. Eine zweite durch zusätzlich 500 g Gewicht beschwerte Glasplatte wurde darauf gestellt.

Nach ca. 12 Stunden befand sich die DNA vollständig in den Nylonmembranen und die Blots wurden abgebaut. Die Slots der Gele wurden mit einem Bleistift auf den Membranen kenntlich gemacht. Anschließend wurden die Membranen für 2 min in 4 $\times$ SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen. Nach ca. 15-minütigem Lufttrocknen wurde ein autocrosslinking durchgeführt, um die DNA fest an die Membranen zu binden. Hierzu wurden die trockenen Nylonmembranen in den UV Stratalinker 2400 (Stratagene) gelegt, der 12 Sekunden lang den Auto Cross Link mittels UV-Strahlen vornahm. Bis zur weiteren Verwendung wurden die fertigen Blots in Briefumschlägen aufbewahrt.

### 7.3 Southern Blot

Mittels Southern Blot erfolgte für diese Versuche die quantitative Auswertung der RT-PCR.

### 7.3.1 Insertisolierung

Zur Herstellung eines Inserts wurden ca. acht PCR-Ansätze benötigt, in denen das gesuchte Zytokin nachgewiesen worden war. Diese sogenannten positiven Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und wie beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden möglichst präzise aus dem Gel ausgeschnitten und in Eppendorfgläsern ausgewogen. Die DNA-Extraktion aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin Extract Kits (Macherey-Nagel).

Zu jeweils 100 mg Agarosegel wurden 300  $\mu\text{l}$  NT1-Puffer gegeben und 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei die Proben alle zwei bis drei Minuten kurz gevortext wurden. Danach erfolgte die Überführung der Proben in NucleoSpin-Gefäße und eine Zentrifugation für 60 sek bei  $15 \cdot 1000 \text{ min}^{-1}$  (Eppendorf-Zentrifuge 5415 C). Der Überstand wurde verworfen. Zu den Proben wurde nun je 750  $\mu\text{l}$  NT3-Puffer gegeben und erneut für 60 sek bei  $15 \cdot 1000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt. Nach dem zweiten Waschen mit NT3-Puffer wurde der Überstand verworfen und die Proben nochmals für 60 sek bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert um den NT3-Puffer möglichst vollständig zu entfernen. Den Proben wurde nun 50  $\mu\text{l}$  10 mM Tris/HCl pH 8,5 zugefügt und anschließend erneut für 60 sek bei  $15 \cdot 1000 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert.

Zur Kontrolle der DNA-Extraktion wurden 5  $\mu\text{l}$  der Proben mit 3  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser und 1,5  $\mu\text{l}$  DNA Loading Puffer gemischt und eine Elektrophorese durchgeführt. Es zeigten sich deutliche Banden der entsprechenden Fragmentlängen.

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA fand das TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) Verwendung. Zur „TOPO-Cloning“-Reaktion wurden je 2  $\mu\text{l}$  der extrahierten DNA mit 2  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser und 1  $\mu\text{l}$  pCR-TOPO Vektor gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Für die folgende „One-Shot“-Transformations-Reaktion wurde jeweils 2  $\mu\text{l}$  0,5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol in ein Gefäß mit 50  $\mu\text{l}$  kompetenten Zellen, den sogenannten "One shot cells" gegeben und 2  $\mu\text{l}$  der Proben aus der "TOPO-Cloning"-Reaktion hinzugefügt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis folgten 30 sek Erwärmung bei 42 °C und nochmals 2 min Inkubation auf Eis. Die Proben wurden dann mit 250  $\mu\text{l}$  raumtemperiertem SOC-Medium versetzt und für 30 min horizontal geschüttelt.

100  $\mu\text{l}$  jeder Transformationslösung wurden auf einer 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin enthaltenden LB-Platte verteilt und für ca. 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Mit einer nach jedem Arbeitsschritt desinfizierten und ausgeglühten Impföse nahm man ca. 10 weiße Kolonien zur Analyse ab und kultivierte sie getrennt in je 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium für 12 Stunden.

Zur Isolierung der Plasmid DNA wurden die Kulturen für 10 min bei 200 g zentrifugiert, die Pellets anschließend in je 150  $\mu\text{l}$   $1 \times \text{TE}$ -Puffer resuspendiert und dann in Eppendorf Gefäße überführt. 5  $\mu\text{l}$  einer Lysozymlösung, die 20 mg Lysozym / ml  $1 \times \text{TE}$ -Puffer enthielt, wurde den Proben hinzugefügt. Es folgten 10 min Inkubation und Schütteln bei Raumtemperatur. 150  $\mu\text{l}$  Alkaline-Lysis Puffer pH 10,0 wurden hinzupipettiert und die Proben nochmals 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und geschüttelt. Die Lösung wurde dadurch klar. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Neutralisations-Lösung folgte vorsichtiges Schwenken der Proben und eine Inkubationsphase von 10 min bei -20 °C.

Nach 10 min Zentrifugieren bei 12000 g bei 4 °C wurden die Überstände in neuen Eppendorfgläsern mit je 750  $\mu$ l Isopropanol vermischt. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation und anschließendem Zentrifugieren bei 12000 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Pellets in je 700  $\mu$ l Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 12000 g und 4 °C für 10 min wurde das Ethanol entfernt und die Pellets im DNA Speed Vac (Savant) getrocknet. Danach wurde die DNA in je 50  $\mu$ l TE-Puffer mit 2  $\mu$ l Rnase (1mg/ml) aufgenommen.

Die Plasmid DNA wurde mittels Restriktionsanalyse untersucht. Man ließ 3  $\mu$ l der DNA Lösung restringieren und testete anschließend das Ergebnis auf einem Agarosegel.

2  $\mu$ l Puffer H, 1  $\mu$ l Enzym, 14  $\mu$ l Wasser und 3  $\mu$ l Plasmid DNA-Lösung wurde vermischt und eine Stunde bei 37 °C restringiert.

Zur Herstellung der Inserts fanden folgende Restriktionsenzyme Verwendung:

$\beta$ -Aktin: Fok I / Mae III

IFN- $\gamma$ : MSE 1

TGF- $\beta$ : BstE II / Sma I

IL-10: Mbo I

### 7.3.2 Radioaktive Markierung der Inserts

Zur radioaktiven Markierung der Inserts wurde das Prime-it II Random Labeling Kit (Stratagene) verwendet. Alle Reaktionsschritte erfolgten auf Eis und unter Beachtung der Strahlenschutzvorschriften.

Die Inserts wurden für zwei Minuten zentrifugiert.

12,5 ng DNA, mindestens jedoch 1  $\mu$ l Insertlösung wurden mit 5  $\mu$ l Primer versetzt, mit VE-Wasser auf 17  $\mu$ l Volumen aufgefüllt, 5 min bei 95 °C inkubiert und wieder auf Eis gestellt. Anschließend wurde erst 5  $\mu$ l 5 $\times$ Puffer für ATP hinzugegeben, dann 2,5  $\mu$ l ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dATP (10 mCi/ml) und 0,5  $\mu$ l Klenow-Polymerase. Nach 2 bis 10 min Inkubation bei 37 °C wurde 1  $\mu$ l Stop-Mix hinzugefügt.

Während des 95 °C Inkubationsschrittes werden die Doppelstränge des DNA-Fragmentes voneinander getrennt. Unter Verwendung der hinzugefügten Hexanukleotide, den Random Primern, wird DNA komplementär zu der eingesetzten cDNA synthetisiert. Durch den Einbau des radioaktiven ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dATP wird der neu synthetisierte DNA-Strang markiert.

### 7.3.3 Aufreinigung über die Säule

Durch Aufreinigung über die Biogel P 60 Säule (Stratagene) wird das nicht eingebaute radioaktive dATP und der blaue Farbstoff, der ihm aus Sicherheitsgründen beigelegt ist, entfernt. Auch diese Arbeitsschritte erfolgten unter genauer Einhaltung der Strahlenschutzvorschriften.

Die über einem Eppendorfglas befestigte Säule wurde mit 70  $\mu$ l STE equilibriert bis der erste Tropfen am unteren Säulenende erschien. Die radioaktiv markierte DNA-Lösung wurde mit STE auf 70  $\mu$ l aufgefüllt, in die Säule gespritzt und aufgefangen. Anschließend wurde nochmals 70  $\mu$ l STE in die Säule gespritzt und in einem neuen Eppendorfglas aufgefangen. Aus beiden Gefäßen

wurden je 3  $\mu$ l Flüssigkeit mit dem Geigerzähler (Contamat, FAG) ausgemessen. Die Aktivität sollte mindestens 600 Bequerel sein.

#### **7.3.4 Hybridisierung**

Die ohne Überschneidung in 50 ml Falcon-Röhrchen gelegten Blotts wurden mit 3 ml Church-Buffer pro Röhrchen für 10 min bei 65 °C unter ständigem Drehen vorhybridisiert.

Die radioaktiv markierte DNA wurde 5 min bei 95 °C gekocht und danach auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Die gesamte DNA-Lösung wurde mit 3 ml Church-Buffer vermischt und gegen die Vorhybridisierungslösung in den Falcon-Röhrchen ausgetauscht.

Anschließend erfolgte unter ständigem Drehen eine 14-stündige Inkubation der Röhrchen bei 65 °C. Danach wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und durch 10 ml 65 °C warmen Waschpuffer ersetzt. Nach kurzem Schwenken wurde der Waschpuffer abgegossen und die Blots in einer Schale 5 min bei 37 °C nochmals in Waschpuffer geschwenkt. Diesen Waschvorgang wiederholte man noch zweimal für je 35 min bei 65 °C mit frischem Waschpuffer.

Anschließend wurden die Blots in Gefrierbeuteln eingeschweißt und je nach Strahlungsintensität 30 bis 60 min auf die Fuji Imaging Plate Type BAS-III S (Fuji) gelegt, wobei der Screen von einer Bleikassette umgeben war.

Es folgte die Auswertung am Phospho-Imager.

### **7.4 Isolation von Milzzellen und Lymphknotenzellen aus der Maus**

Aus frisch getöteten Tieren wurden die Milz und die poplitealen Lymphknoten steril entnommen, ohne die Organkapsel zu zerstören, und weitestgehend vom umgebenden Bindegewebe befreit.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Milz bzw. die Lymphknoten mit dem Stempel einer 2 ml Spritze auf einem sterilen Sieb mit Maschenweite 125  $\mu$ m zerrieben. Währenddessen wurden sie mit PBS feucht gehalten, die Zellen der zerkleinerten Organe durch das Sieb gespült und in einer Petrischale aufgefangen. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden in 12 ml PBS aufgenommen und 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und den Zellen 2 ml PBS zugegeben. Zur Lyse der enthaltenen Erythrozyten in der Milzzellsuspension wurde ein Volumenanteil Zellsuspension mit zwei Volumenanteilen Lysepuffer vermischt, 20-25 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen.

#### **7.4.1 Anreicherung der T-Zellen**

Mit Hilfe eines varioMACS (magnetischer Zellsortierer) wurden die Milz-T-Zellen durch Depletion von B-Zellen angereichert. Er besteht aus einem starken Magneten, in den eine mit kunststoffbeschichteter Stahlwolle gefüllte Trennsäule eingespannt wird. Bei der Passage einer Zellsuspension durch das starke Magnetfeld wird die magnetisch markierte Zellpopulation durch magnetische Wechselwirkung an die Stahlwolle gebunden. Zur Anreicherung von T-Zellen wurden die B-Lymphozyten magnetisch markiert. Dies erfolgte durch die Bindung

der B-Zellen an paramagnetische Partikel (Beads) durch eine Ag-Ak-Reaktion gegen ein Oberflächenantigen (B220). Die Beads sind an Anti-B220 gekoppelte B220 Microbeads, supermagnetische Dextranpartikel in Konjugation mit dem monoklonalen anti-Maus-B220-Antikörper [124]. In einer FACScan Analyse (FACScan flow cytometer, Becton Dickinson) wurde bestätigt, daß die daraus resultierende Zellpopulation mindestens 85% T-Zellen enthielt.

#### 7.4.2 FACScan Analyse

Das fluoreszenzaktivierte Durchflußzytometer (FACScan) enthält eine Laserquelle, die Licht einer Wellenlänge von 488 nm ausstrahlt (Argon, 15 W). Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorescein-isothiocyanat, Phycoerythrin), die über den Antikörper Anti-Thy 1.2 an die nachzuweisende Zellpopulation gebunden sind, werden zur Emission von Licht charakteristischer Wellenlängen angeregt.

Die Analyse der T-Zellen wurde durchgeführt, um die Güte der T-Zellen Anreicherung zu bestimmen. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der T-Zellen gemessen. Um tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, wurden die Proben vorher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PJ) (1 mg/ml, 1  $\mu$ l auf 200  $\mu$ l Probe) versetzt. PJ dringt in tote Zellen ein und interkaliert hier in die DNA. Erwies sich die T-Zellen Anreicherung als erfolgreich, wurden die Zellen wie im folgenden beschrieben weiterverwendet.

### 7.5 [3H]-Thymidin-Proliferationsassay

Bei der Zellproliferation kommt es zu einer DNA-Neusynthese. Bietet man proliferierenden Zellen radioaktiv markierte Nukleotide im Medium an, werden diese für die DNA-Synthese verwendet. Die auf diese Weise in die Zellen aufgenommene Radioaktivität kann gemessen und so die zelluläre Proliferation quantifiziert werden.

#### 7.5.1 Milz-T-Zellen

Die Milz-T-Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen.

In einem Gesamtvolumen pro Well von 200  $\mu$ l RPMI 1640 mit 10% FBS 2mM Glutamin, 50  $\mu$ M 2-ME, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen 3 Tage in Anwesenheit von 100  $\mu$ g/ml OVA und  $5 \times 10^5$  bestrahlten syngenenischen weißen Milzzellen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25  $\mu$ Curie [3H]-Thymidin pro Well angeregt.

#### 7.5.2 Lymphknotenzellen

$5 \times 10^5$  Zellen pro Well wurden in einer 96 Well Gewebekulturplatte in Anwesenheit von OVA (100  $\mu$ g/ml) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l RPMI-1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 2mM L-Glutamin, 50 $\mu$ M 2-ME, 100U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25  $\mu$ Curie [3H]-Thymidin pro Well angeregt und 18 Stunden inkubiert.

Nach 18 Stunden Inkubation wurden die Zellen mittels eines Vielkanal-Zellerntegerätes auf Filterpapier gebracht, die Filterpapiere ausgestanzt und in Szintillationsgefäße gegeben. Hier wurden je 3 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugefügt und die geschlossenen Röhrchen im Beta-Counter gemessen. Durch die

beim Zerfall des radioaktiv markierten Thymidins freiwerdende Energie wird die Szintillationsflüssigkeit zur Emission von Licht angeregt. Diese Lichtblitze werden von einer Fotозelle gezählt. Der Beta-Counter gibt die pro Zeiteinheit gemessene Anzahl von Lichtblitzen als „counts per minute“ (cpm) für die einzelnen Proben an. Die cpm-Werte geben Auskunft über die Menge der vorhandenen Radionukleotide und somit über das Ausmaß der Proliferation. Da bei der [3H]-Thymidin Messung nur durchschnittlich jedes zweite bis dritte radioaktive Zerfallsereignis registriert wird, gibt der cpm-Wert nur etwa 30-50% der stattgefundenen Zerfälle an.

## 7.6 Zytokinkonzentrationsbestimmung mittels ELISA in Kulturüberständen

Milz-T-Zellen und Lymphknotenzellen wurden wie oben beschrieben, jedoch ohne Zusatz von [3H]-Thymidin, isoliert und inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und der Zytokinbestimmung zugeführt.

Zur Kontrolle wurden in allen ELISAs mindestens Doppelwerte erhoben.

### 7.6.1 TGF- $\beta$ ELISA

Die Bestimmung von TGF- $\beta$  in Kulturüberständen wurde mit dem TGF- $\beta$  Emax Immunoassay System von Promega durchgeführt. Da mit dem Emax System nur biologisch aktives TGF- $\beta$  gemessen werden kann, wurde um auch latentes TGF- $\beta$  in den Kulturüberständen messen zu können, eine Säureaktivierung durchgeführt [221]. Dies geschah mit PBS (mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) und 1N HCl. Der pH- Wert fiel auf 2-3. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der pH- Wert mit 1N NaOH auf 7-8 neutralisiert. Die Quantifizierung des TGF- $\beta$  kann mit diesem Immunoassay System im Bereich von 32 bis 1000 pg/ml durchgeführt werden. Mittels im Immunoassay-System mitgelieferten rekombinantem humanem TGF- $\beta$ 1 wurden im Bereich 15,6-1000 pg/ml durch Verdünnungsreihen lineare Standardkurven erstellt ( $R^2 \geq 0,998$ ). Anhand der Standardkurven wurde die Konzentration der Proben ermittelt. Als Negativkontrolle diente der Einsatz von TGF- $\beta$  Probenpuffer ohne Zusatz einer Probe. Das anschließende Vorgehen entsprach wie folgt etwa dem Herstellerprotokoll:

Reaktionsschritt	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]/well	Zeit	Temperatur
1. Coating mit Primärantikörper	1:1000 in TGF- $\beta$ 1 -Coating Puffer	50	16-20 h	4°C
2. Blockierung mit TGF- $\beta$ Blockierungspuffer		135	35 min	37°C
3. Bindung von Standard, Proben und Negativkontrolle	variabel in TGF- $\beta$ Probenpuffer	50	90 min	20°C
4. 5×waschen mit TGF- $\beta$ 1-Waschpuffer		250		

5. Inkubation mit Sekundärantikörper	1:1000 in TGF- $\beta$ Probenpuffer	50	2 h	20°C
6. 5×waschen mit TGF- $\beta$ -Waschpuffer		250		
7. Inkubation mit Tertiärantikörper-HRP-Konjugat (Horseradish peroxidase)	1:2000 in Probenpuffer	50	2 h	20°C
8. Reaktion mit TMB-One Substratlösung		50	4 h	20°C
9. Stopp mit 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		50		
10. Auswertung mit ELISA-Reader, Wellenlänge: 450nm Innerhalb von 30 min nach Zufügen der Stopplösung				

### 7.6.2 IL-10 und IFN- $\gamma$ -ELISA

Die Konzentrationen von IL-10 und IFN- $\gamma$  in den Kulturüberständen wurden mit OptEIA-Sets von Pharmingen bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng/ml. Mittels des im Set mitgelieferten rekombinanten Maus IL-10 bzw. Maus IFN- $\gamma$  Standards wurde im Bereich 31,3 bis 2000 pg/ml über Verdünnungsreihen mit jedem durchgeführten ELISA eine lineare Standardkurve mit  $R^2 \geq 0,995$  erstellt. Als negativ Kontrolle diente PBS mit 10% FBS pH 7,0. Alle Reaktionsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Konzentration in den Proben wurde durch Vergleich mit den Standardkurven ermittelt. Der ELISA wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Reaktionsschritt	Konzentration	Volumen[ $\mu$ l]/well	Zeit
1. Coating mit Primärantikörper anti-Maus IL-10 bzw. IFN- $\gamma$	1:250	50	15-20 h
2. 3×Waschen mit PBS/Tween-Waschpuffer		250	
3. Blockierung mit PBS/10%FBS		100	1 h
4. 3×Waschen mit PBS/Tween-Waschpuffer		250	
5. Bindung von Standard, Proben und Negativkontrolle in PBS mit 10% FBS	variabel	50	2 h
6. 5×Waschen mit PBS/Tween-Waschpuffer		250	
7. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper und Streptavidin-HRP-Konjugat in PBS mit 10% FBS	je 1:250	50	1 h

8. 7×Waschen mit PBS/ Tween-Waschpuffer		250	
9. Reaktion mit TMB- Substratlösung		50	30-40 min
10. Stopp mit 2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		50	
11. Auswertung mit ELISA-Reader Testwel- lenlänge 450 nm Refe- renzwellenlänge 550 nm Innerhalb von 30 min nach Zugabe von H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			

### 7.6.3 ELISA zum Nachweis OVA-spezifischer Antikörper

Zum Nachweis OVA-spezifischer Antikörper im Serum unbehandelter für OVA oral toleranter und zusätzlich subkutan mit Bleichlorid behandelter NOD Mäuse wurde wie folgt ein ELISA durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde PBS mit 1% BSA verwendet, als Positivkontrolle Mäuseserum, in dem bereits vorher mittels ELISA anti-OVA Antikörper nachgewiesen worden waren.

Reaktionsschritt	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]/well	Zeit	Tem- pera- tur
1. Coating mit OVA	100 $\mu$ g/ml in PBS	50	1	37°C
2. Blocken mit PBS/1% BSA		50	30 min	37°C
3. 3×Waschen mit PBS/ Tween20		250		
4. Bindung von Proben, Po- sitivkontrollen und Negativ- kontrollen	1:40 in PBS/ 1% BSA	50	1 h	37°C
5. 4×Waschen mit PBS/ Tween20		250		
6. Inkubation mit biotinylier- tem Sekundärantikörper anti- Maus in PBS/ 1% BSA	IgG1,IgG: 1:2000 IgG2a: 1:100	50	30 min	37°C
7. 4×Waschen mit PBS/ Tween20		250		
8. Avidin-Peroxidase	1:1000 in PBS/ 1% BSA	50	30 min	37°C
9. 3×Waschen mit PBS/ Tween20		250		
10. 1×Waschen mit Zitrat- puffer		250		
11. Farbreaktion mit ABTS- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	je 2 Tropfen in 5 ml Zitratpuf- fer	50	10 min	20°C

12. Stopp mit 2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		50		
13. Auswertung mit ELISA-Reader, Testwellenlänge 405 nm, Referenzwellenlänge 492 nm 15 min nach Zugabe von H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				

## 7.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad-Prism Software Version 2.01 durchgeführt.

Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte plus Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit one way ANOVA und Nachtest nach Newman-Keuls und Bonferroni. Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen gekennzeichnet mit  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*).

## Teil III

# ERGEBNISSE

## 8 Natürlicher Verlauf der altersabhängigen Zytokingenexpression

60-80% weiblicher NOD-Mäuse erkranken im Verlauf ihres Lebens an IDDM. Dies legt nahe, daß sich die altersabhängigen Veränderungen ihres Immunsystems von dem nicht Diabetes-prädestinierten Mäuse unterscheiden. Da das Darmimmunsystem in der Diabetogenese eine wichtige Rolle spielt [227, 14, 186, 228, 229, 230, 105], wurde bei 5, 10 und 14 Wochen alten weiblichen NOD-Mäusen bzw. C57BL/6-Mäusen die Zytokingenexpression in Dünndarmgewebe mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht, mit dem Ziel, über den natürlichen Verlauf der Zytokingenexpression bei den beiden Mausstämmen Aufschluß zu erhalten.

Um einen Vergleich von Meßwerten für verschiedene cDNA-Proben einer PCR-Reaktion durchführen zu können, wurde die Menge an PCR-Produkt [BLU/ $\mu$ l] für eine bestimmte mRNA durch die Menge des PCR-Produktes für das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Aktin [BLU/ $\mu$ l] in der selben cDNA-Probe dividiert. Der so errechnete relative Wert für die Menge einer bestimmten mRNA wurde als arbitrary unit [a.u.] in den entsprechenden Graphen eingetragen. Dieses Vorgehen erlaubt es, semiquantitative Aussagen über die Expression bestimmter Gene zu machen.

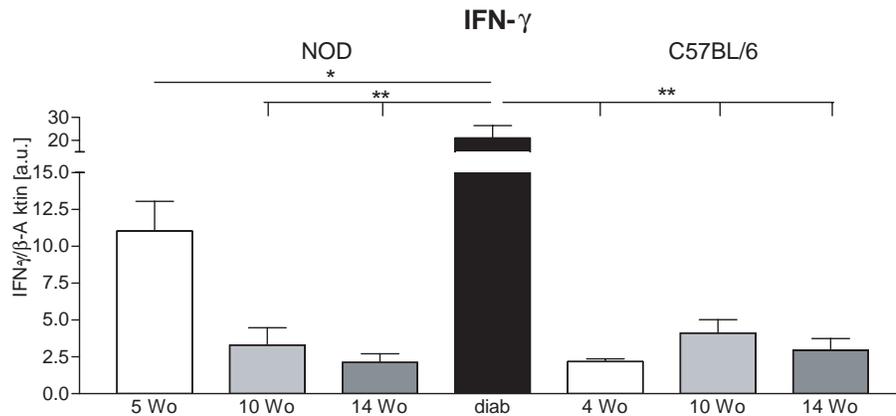


Abbildung 1: Natürlicher Verlauf der IFN- $\gamma$  Zytokingenexpression im Darmgewebe von NOD- und C57BL/6-Mäusen

Die Tiere wurden im Alter von 5 (weiß), 10 (hellgrau), 14 Wochen (dunkelgrau), bzw. beim Einsetzen einer Diabetessymptomatik im Alter von 14-16 Wochen (schwarz) getötet. Es wurden Darm, Pankreas und Blut entnommen. Aus den Därmen wurden die PP entfernt und das Darmgewebe auf das Zytokin mRNA Muster untersucht. Die Menge der jeweiligen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung als a.u. (arbitrary units) bei 6-9 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*)

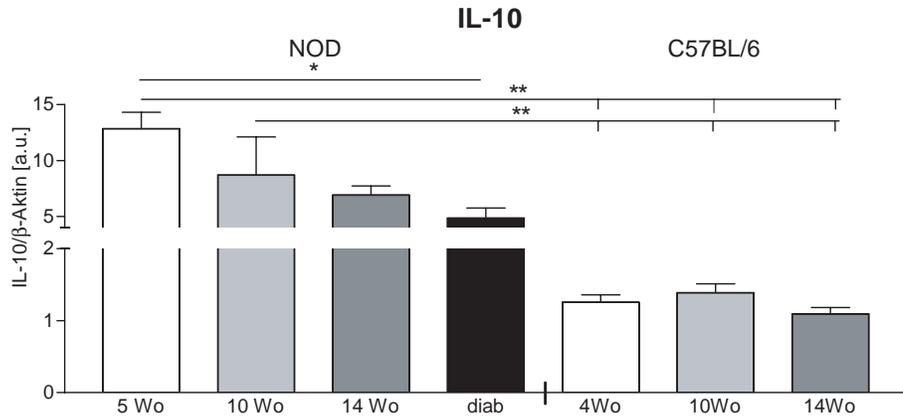


Abbildung 2: Natürlicher Verlauf der IL-10 Zytokinexpression im Darmgewebe von NOD- und C57BL/6-Mäusen

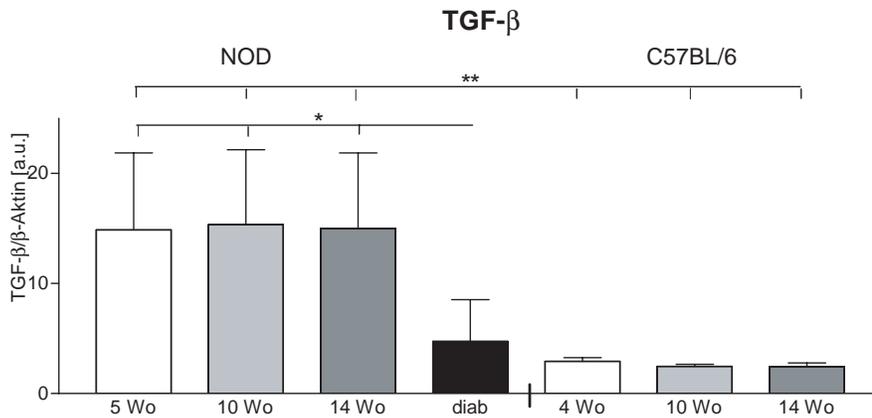


Abbildung 3: Natürlicher Verlauf der TGF-β Zytokingenexpression im Darmgewebe von NOD- und C57BL/6-Mäusen

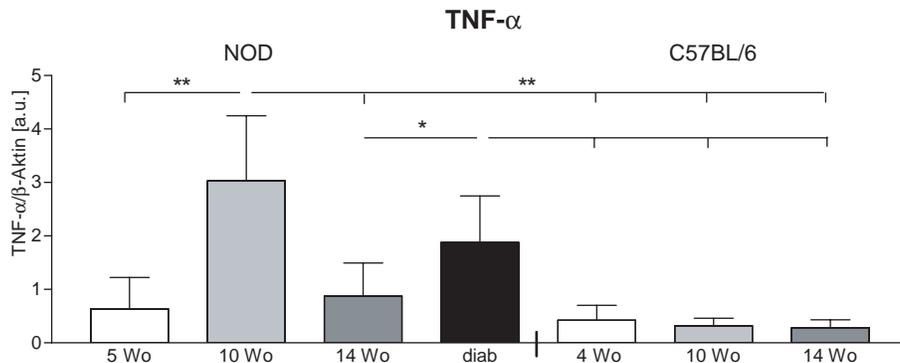


Abbildung 4: Natürlicher Verlauf der TNF-α Zytokingenexpression im Darmgewebe von NOD- und C57BL/6-Mäusen

Zu Abb. 2-4: Die Tiere wurden im Alter von 5 (weiß), 10 (hellgrau), 14 Wochen (dunkelgrau), bzw. beim Einsetzen einer Diabetessymptomatik im Alter

von 14-16 Wochen (schwarz) getötet. Es wurden Darm, Pankreas und Blut entnommen. Aus den Därmen wurden die PP entfernt und das Darmgewebe auf das Zytokin mRNA Muster untersucht. Die Menge der jeweiligen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung als a.u. (arbitrary units) bei 6-9 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Die Versuche zeigen, daß bei NOD-Mäusen nach einem anfänglichen tendenziellen Abfall der Expression des proinflammatorischen Th1-Zytokins  $\text{IFN-}\gamma$  von der 5. bis zur 14. Lebenswoche, die Expression für dieses Zytokin beim Einsetzen der Diabetessymptomatik signifikant erhöht ist (Abb. 1). Bei C57BL/6 unterliegt der Verlauf der Expression dieses Zytokins zwar Schwankungen, jedoch kommt es nicht zu einer signifikanten Zunahme mit dem Alter (Abb. 1).

Die Expression des Th2-Zytokins IL-10 nimmt bei NOD-Mäusen mit dem Alter ab und ist bei diabetischen Tieren signifikant niedriger als bei Tieren im Alter von 5 Wochen (Abb. 2). Bei C57BL/6 zeigen sich kaum altersabhängige Schwankungen (Abb. 2).

Ähnlich sind die Ergebnisse in bezug auf das Th3-Zytokin  $\text{TGF-}\beta$  (Abb.3). Auch dieses wird bei NOD-Mäusen nach dem Einsatz des Diabetes signifikant weniger exprimiert, während bei C57BL/6 keine auffälligen Veränderungen zu beobachten sind.

Für das Th1-assoziierte Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$  ist außer bei den diabetischen Mäusen auch im Alter von 10 Wochen eine erhöhte Expression nachweisbar (Abb. 4). Bei C57BL/6 hingegen ist hier die Menge mit dem Alter tendenziell abnehmend.

Außerdem ist die Expression von IL-10 (Abb. 2),  $\text{TGF-}\beta$  (Abb. 3) bzw.  $\text{TNF-}\alpha$  (Abb.4) bei C57BL/6-Mäusen niedriger als bei NOD, teilweise sogar hochsignifikant.

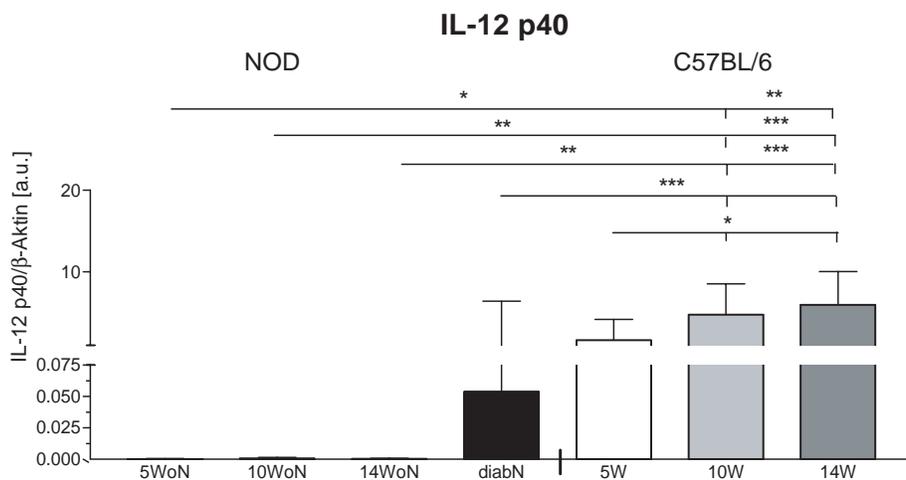


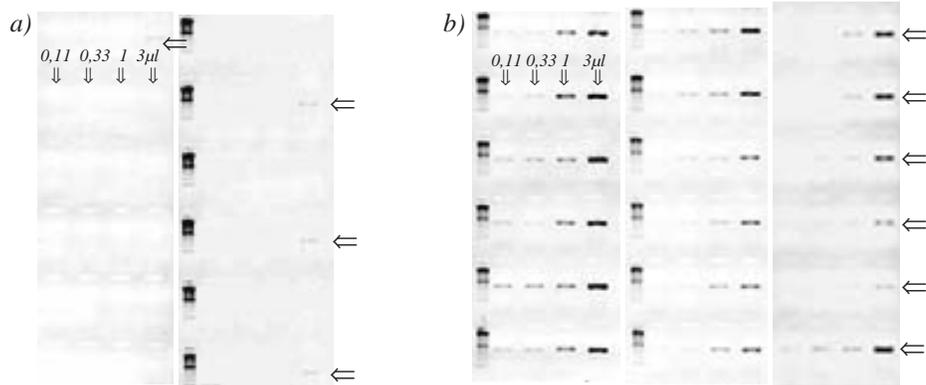
Abbildung 5: Natürlicher Verlauf der IL-12 p40 Zytokingenexpression im Darmgewebe von C57BL/6-Mäusen.

Die Tiere wurden im Alter von 5 (weiß), 10 (hellgrau), 14 Wochen (dunkelgrau), bzw. beim Einsetzen einer Diabetessymptomatik im Alter von 14-16 Wochen (schwarz) getötet. Es wurden Darm, Pankreas und Blut entnommen. Aus den Därmen wurden die PP entfernt und das Darmgewebe auf das Zyto-

kin mRNA Muster untersucht. Die Menge der jeweiligen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung als a.u. (arbitrary units) bei 6-9 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

IL-12 p40 ist bei NOD-Mäusen erst beim Einsetzen des Diabetes schwach im Darmgewebe nachweisbar (Abb. 5 und Abb. 6a). Ein Kontrollversuch zeigte bei 5 Wochen alten Tieren zusätzlich eine schwache Bande, ansonsten war das Ergebnis vergleichbar. Das Auftreten dieses Zytokins korreliert mit der verstärkten Expression von  $\text{IFN-}\gamma$  bei diabetischen NOD-Mäusen (Abb. 1). Im Darm der C57BL/6-Mäuse kommt es zu einem nicht signifikanten Anstieg der Expression dieses Zytokins mit dem Alter (Abb. 5 und Abb. 6b).

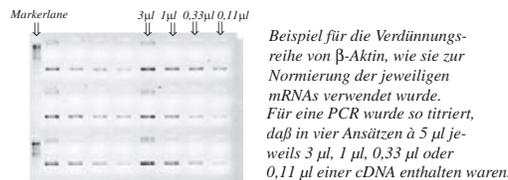
Da für die PCRs beider Stämme jeweils dieselbe Reagenzienmischung verwendet wurde und die  $\beta$ -Aktin-Elektrophoresebanden qualitativ gleich waren (Beispiel Abb. 7), handelt es sich bei dem dargestellten Ergebnis wahrscheinlich nicht um methodisch bedingte Unterschiede.



Der linke Teil dieser Abbildung zeigt das Gel nach Elektrophorese bei 5 Wochen alten NOD-Mäusen, stellvertretend für 5-14 Wochen alte, im rechten Teil sind die p40 Banden bei diabetischen NOD-Mäusen schwach erkennbar durch Pfeile markiert. Bei den heller erscheinenden "Banden" handelt es sich um die Slots, in die die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, In der Bildmitte sind die Markerlanes zu sehen.

IL-12 p40 Banden bei 14, 10 bzw. 4 Wochen alten C57BL/6 Mäusen durch Pfeile markiert. Auch in dieser Abbildung sind die hellen "Banden" die Slots, die erste und sechste Lane jeder Reihe sind Markerlanes. Für die Verdünnungsreihe einer PCR wurde so titriert, daß in vier Ansätzen à 5 µl jeweils 3 µl, 1 µl, 0,33 µl oder 0,11 µl einer cDNA enthalten waren.

Abbildung 6: IL-12 p40- Elektrophoresegel



Beispiel für die Verdünnungsreihe von  $\beta$ -Aktin, wie sie zur Normierung der jeweiligen mRNAs verwendet wurde. Für eine PCR wurde so titriert, daß in vier Ansätzen à 5 µl jeweils 3 µl, 1 µl, 0,33 µl oder 0,11 µl einer cDNA enthalten waren.

Abbildung 7:  $\beta$ -Aktin Elektrophoresegel

In den Abbildungen 8 und 9 zeigt sich für NOD-Mäuse eine signifikante Verschiebung des Zytokingleichgewichtes in Richtung Th1, hier  $\text{IFN-}\gamma$ , während das Gleichgewicht bei C57BL/6 nur kleinen Schwankungen unterliegt. Bezüglich  $\text{TGF-}\beta$  ist das Zytokinverhältnis bei diabetischen NOD-Mäusen gegenüber allen Vergleichsgruppen hochsignifikant in Richtung  $\text{IFN-}\gamma$  verschoben (Abb. 8), während bezüglich IL-10 bei diabetischen NOD zwar gegenüber jüngeren NOD eine hochsignifikante Verschiebung zu  $\text{IFN-}\gamma$  zu beobachten ist, jedoch nicht gegenüber den C57BL/6 Vergleichsgruppen (Abb. 9). Allerdings tendiert bei 10 und 14 Wochen alten C57BL/6 Mäusen das Zytokin-mRNA-Profil signifikant bzw. hochsignifikant mehr zu  $\text{IFN-}\gamma$  als bei 5 bis 14 Wochen alten nicht diabetischen NOD-Mäusen (Abb. 9).

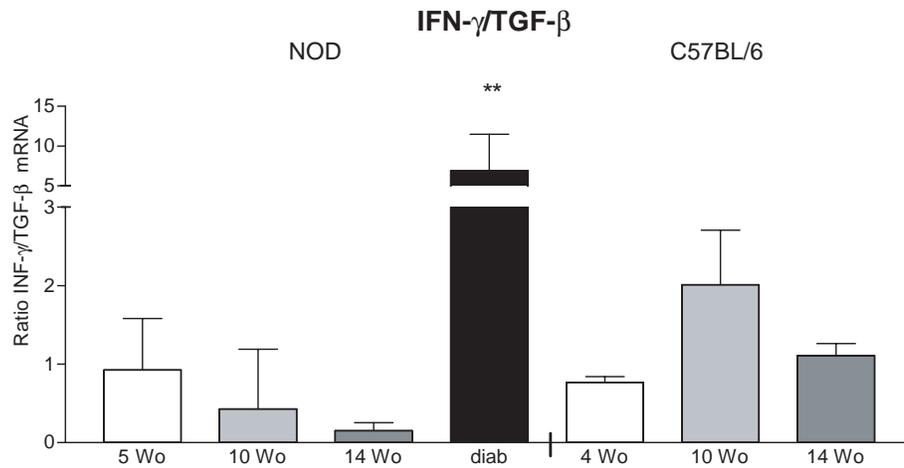


Abbildung 8: Verhältnis von  $\text{IFN-}\gamma$  zu  $\text{TGF-}\beta$

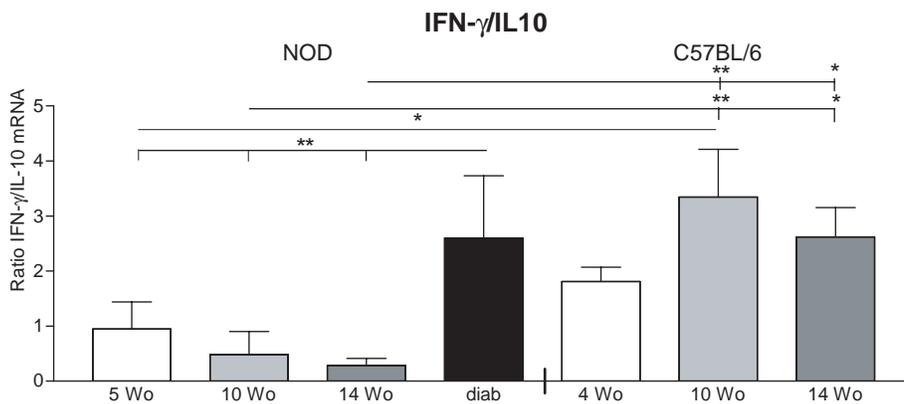


Abbildung 9: Verhältnis von  $\text{IFN-}\gamma$  zu IL-10

Zu Abb.8-9: Die Tiere wurden im Alter von 5 (weiß), 10 (hellgrau), 14 Wochen (dunkelgrau), bzw. beim Einsetzen einer Diabetessymptomatik im Alter von 14-16 Wochen (schwarz) getötet. Es wurden Darm, Pankreas und Blut entnommen. Aus den Därmen wurden die PP entfernt und das Darmgewebe auf das Zytokin mRNA Muster untersucht. Die Menge der jeweiligen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Anschließend wurde zur Veranschaulichung einer eventuellen Verschiebung des Zytokingleichgewichtes der Quotient

aus dem Th1 Zytokin  $IFN-\gamma$  und den Th2 Zytokinen IL-10 bzw. TGF- $\beta$  errechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung dieses Quotienten bei 6-9 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*)

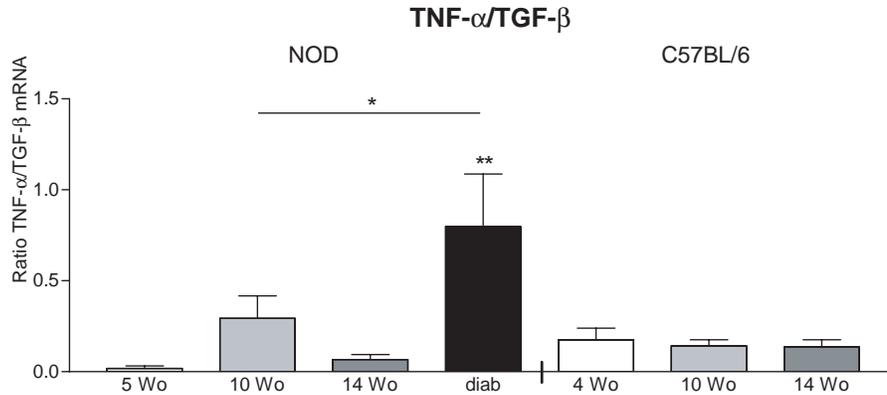


Abbildung 10: Verhältnis von TNF- $\alpha$  zu TGF- $\beta$

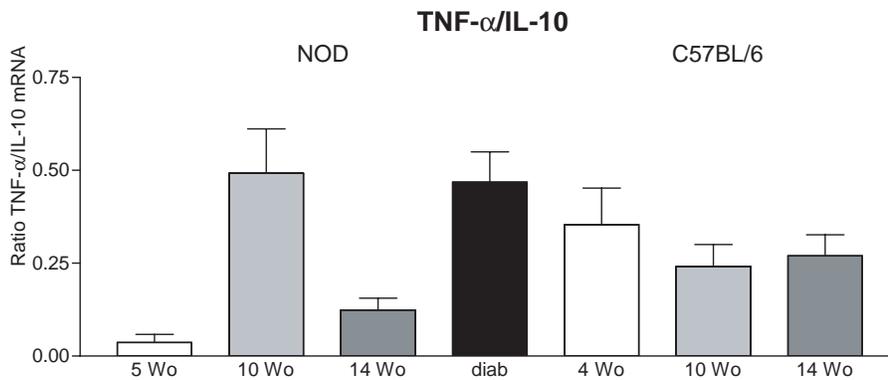


Abbildung 11: Verhältnis von TNF- $\alpha$  zu IL-10

Zu Abb. 10-11: Die Tiere wurden im Alter von 5 (weiß), 10 (hellgrau), 14 Wochen (dunkelgrau), bzw. beim Einsetzen einer Diabetessymptomatik im Alter von 14-16 Wochen (schwarz) getötet. Es wurden Darm, Pankreas und Blut entnommen. Aus den Därmen wurden die PP entfernt und das Darmgewebe auf das Zytokin mRNA Muster untersucht. Die Menge der jeweiligen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Anschließend wurde zur Veranschaulichung einer eventuellen Verschiebung des Zytokinegleichgewichtes der Quotient aus dem Th1 Zytokin TNF- $\alpha$  und den Th2 Zytokinen IL-10 bzw. TGF- $\beta$  errechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung dieses Quotienten bei 6-9 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Das Th1/Th2 Profil gemessen an TNF- $\alpha$  zeigt bei diabetischen NOD auch hier eine tendenzielle Verschiebung zu Th1. Jedoch ist auch im Alter von 10 Wochen tendenziell ein vorübergehendes Überwiegen von Th1 erkennbar; nicht

nur im Vergleich zu jüngeren NOD, sondern auch zu C57BL/6. Bei Quotientenbildung mit IL-10 ist dies deutlicher als mit TGF- $\beta$ , allerdings handelt es sich nicht um signifikante Veränderungen. Bei C57BL/6 bleibt das Verhältnis stabil.

## 9 Einfluß von subkutaner PbCl<sub>2</sub>- Applikation auf die Zytokingenexpression im Dünndarm und die Induktion von oraler Toleranz gegen OVA

Da sich die Vorgänge im Darmimmunsystem der beiden Mausstämmen wie oben beschrieben bereits im Normalzustand deutlich voneinander unterscheiden stellt sich nun die Frage, ob auch die Reaktionen auf Provokation des Immunsystems, zum Beispiel durch Induktion der oralen Toleranz, unterschiedlich sind. Welchen Einfluß kann ein Umwelttoxin wie PbCl<sub>2</sub> hier ausüben? Um Hinweise zur Beantwortung dieser Fragen zu erhalten, wurde an NOD- und C57BL/6-Mäusen die Zytokingenexpression im Dünndarm nach Induktion der oralen Toleranz und mit gleichzeitiger PbCl<sub>2</sub>-Behandlung untersucht.

Über zwei Wochen hinweg erhielten die NOD- bzw. C57BL/6-Mäuse am 1., 3., 6., 8., 10. und 13. Tag je eine Injektion von 10  $\mu$ g PbCl<sub>2</sub> in 100  $\mu$ l NaCl-Lösung (0,5 mg/kgKG) in den Schwanzansatz. Eine zweite Gruppe erhielt in der gleichen Zeit Injektionen des entsprechenden Volumens NaCl-Lösung ohne weitere Zusätze. Den Tieren beider Gruppen wurde am 8., 10. und 13. Behandlungstag je 5 mg OVA in 100  $\mu$ l NaCl-Lösung oral zugeführt. Eine dritte Gruppe Tiere blieb unbehandelt.

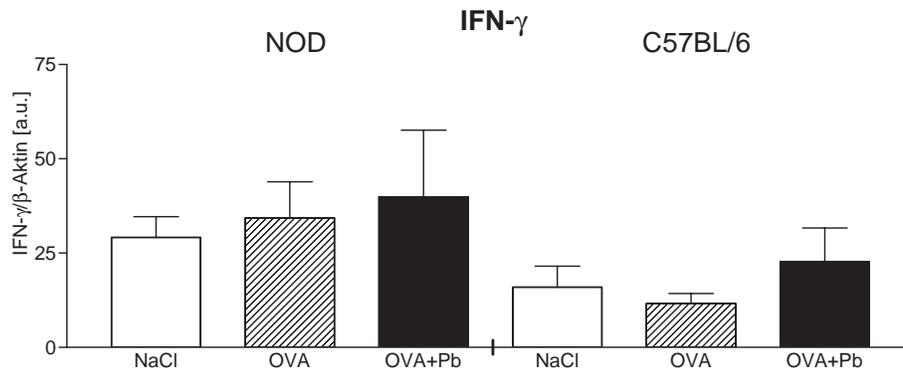


Abbildung 12: Modulation der IFN- $\gamma$  Genexpression im Dünndarm von C57BL/6- und NOD-Mäusen durch Induktion oraler Toleranz mit OVA und durch PbCl<sub>2</sub> nach oraler OVA-Behandlung.

Die 5 bis 6 Wochen alten Mäuse blieben unbehandelt (weiß), wurden oral gegen OVA immunisiert (gestreift) oder zusätzlich zur oralen Immunisierung mit OVA subkutan mit PbCl<sub>2</sub> behandelt (schwarz), entsprechend des oben genannten Schemas. Neun Tage nach der letzten OVA-Gabe wurden die Mäuse getötet und der proximale Teil des Dünndarms wurde zur RNA-Isolation entnommen. Die Menge der jeweils gemessenen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung bei 6 Tieren pro Gruppe als a.u. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*) .

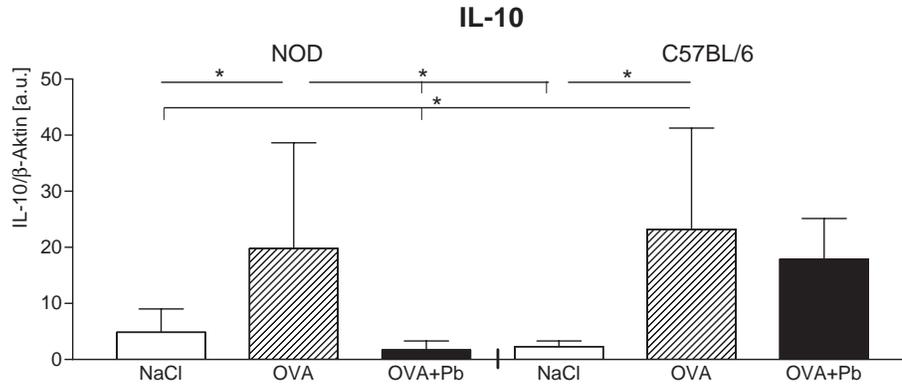


Abbildung 13: Modulation der IL-10 Genexpression im Dünndarm von C57BL/6- und NOD-Mäusen durch Induktion oraler Toleranz mit OVA und durch PbCl<sub>2</sub> nach oraler OVA-Behandlung.

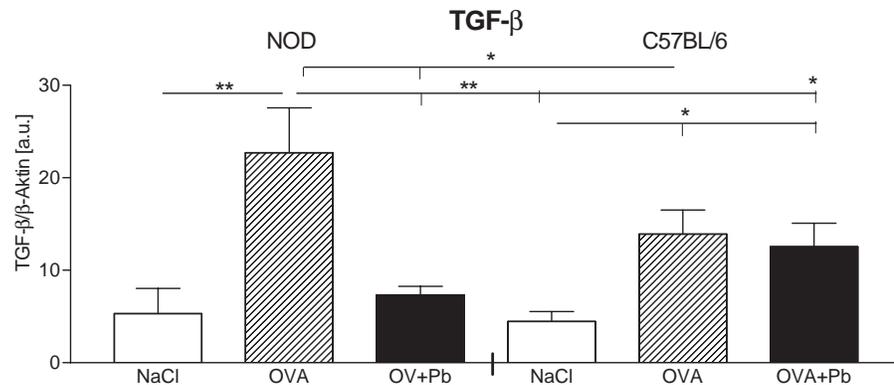


Abbildung 14: Modulation der TGF- $\beta$  Genexpression im Dünndarm von C57BL/6- und NOD-Mäusen durch Induktion oraler Toleranz mit OVA und durch PbCl<sub>2</sub> nach oraler OVA-Behandlung.

Zu Abb. 13-14: Die 5 bis 6 Wochen alten Mäuse blieben unbehandelt (weiß), wurden oral gegen OVA immunisiert (gestreift) oder zusätzlich zur oralen Immunisierung mit OVA subkutan mit PbCl<sub>2</sub> behandelt (schwarz), entsprechend des oben genannten Schemas. Neun Tage nach der letzten OVA-Gabe wurden die Mäuse getötet und der proximale Teil des Dünndarms wurde zur RNA-Isolation entnommen. Die Menge der jeweils gemessenen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung bei 6 Tieren pro Gruppe als a.u. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Die Menge von IFN- $\gamma$  mRNA war im Dünndarm keiner Mäusegruppe signifikant verändert. Weder in den Gruppen, die allein mit OVA behandelt wurden noch in denen, die zusätzlich einer PbCl<sub>2</sub>-Behandlung unterzogen wurden. Auch zwischen den beiden Stämmen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12).

Die Analyse des kontraregulierenden Th2-Zytokins IL-10 zeigte bei beiden Mausstämmen einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression als Reaktion

auf die orale OVA Gabe, kennzeichnend für die orale Toleranz, die hierdurch induziert wurde (Abb. 13).

In NOD-Mäusen, die zusätzlich mit PbCl<sub>2</sub> behandelt worden waren, zeigte sich eine signifikante Suppression der IL-10 Expression verglichen mit den nur mit OVA behandelten Gruppen, während die zusätzliche PbCl<sub>2</sub>-Gabe bei C57BL/6-Mäusen kaum Veränderung im Vergleich zu den nur mit OVA behandelten Vergleichsgruppen erkennen ließ (Abb. 13).

Da TGF- $\beta$  neben IL-10 eine Schlüsselrolle in der Unterdrückung inflammatorischer Prozesse im Darm und der Entwicklung der oralen Toleranz auf Nahrungsmittelantigene spielt, wurde zusätzlich die TGF- $\beta$  Expression untersucht.

Die orale OVA-Gabe erhöhte die TGF- $\beta$  mRNA-Expression in beiden Mausstämmen. Bemerkenswert ist, daß dieser Effekt bei NOD auch gegenüber den Gruppen des Vergleichstammes signifikant bzw. hochsignifikant ist (Abb. 14). Bei C57BL/6 ist die TGF- $\beta$  Expression der oral toleranten gegenüber den unbehandelten Tieren signifikant erhöht (Abb. 14). Bei den zusätzlich mit PbCl<sub>2</sub> behandelten Tieren des NOD-Stammes blieb diese verstärkte Expression aus, und der Wert entspricht etwa dem der unbehandelten Mäuse (Abb. 14). Im Darmgewebe der C57BL/6-Mäuse konnte auch für dieses Zytokin kein Einfluß des PbCl<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Der Unterschied zu den unbehandelten C57BL/6 ist auch hier signifikant (Abb. 14).

Das Verhältnis der gemessenen mRNA Mengen von IFN- $\gamma$ /IL-10 zeigt einen starken Einfluß von PbCl<sub>2</sub> auf die Zytokinproduktion in NOD-Mäusen. Hier ist eine deutliche Verschiebung der Immunreaktion in Richtung IFN- $\gamma$  erkennbar (Abb. 15). Dieser Effekt ist signifikant bzw. hochsignifikant gegenüber allen Vergleichsgruppen. Bei C57BL/6 fehlt dieser Bleieffekt.

Die Auswirkung des oral applizierten OVA stellt sich bei beiden Mausstämmen als signifikante Verschiebung der Immunreaktion in Richtung IL-10 dar (Abb. 15).

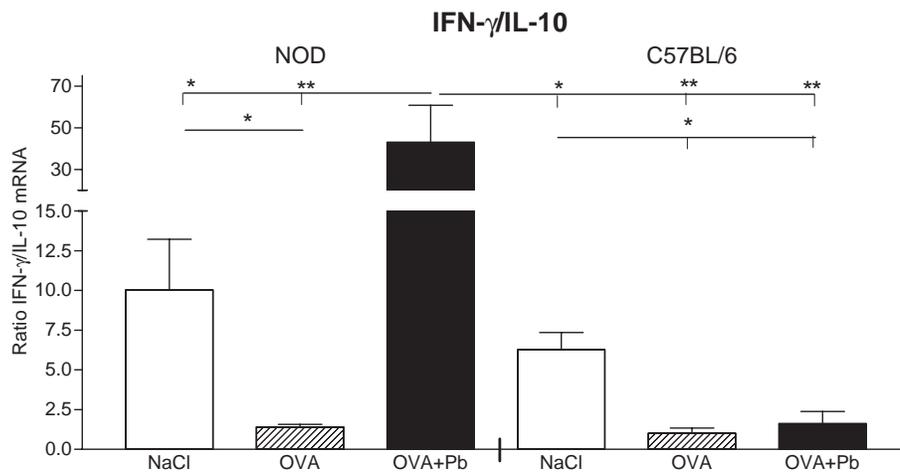


Abbildung 15: Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 im Dünndarm nach Provokation des Immunsystems mit OVA und PbCl<sub>2</sub>

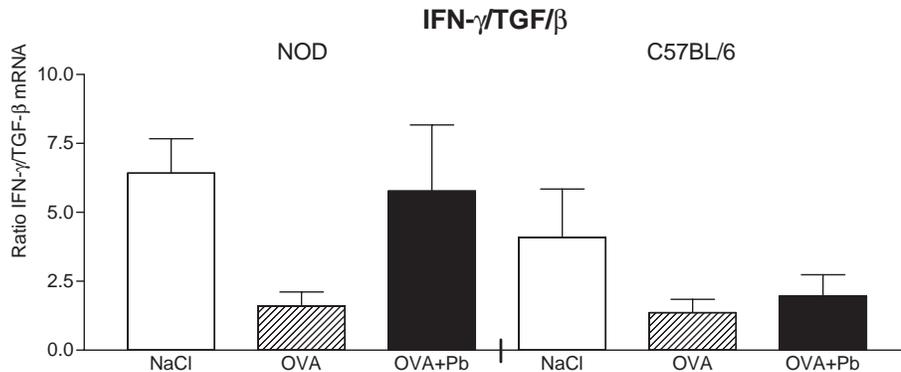


Abbildung 16: Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu TGF- $\beta$  im Dünndarm nach Provokation des Immunsystems mit OVA und PbCl<sub>2</sub>

Zu Abb. 15-16: Die 5 bis 6 Wochen alten Mäuse blieben unbehandelt (weiß), wurden oral gegen OVA immunisiert (gestreift) oder zusätzlich zur oralen Immunisierung mit OVA subkutan mit PbCl<sub>2</sub> behandelt (schwarz), entsprechend des oben genannten Schemas. Neun Tage nach der letzten OVA-Gabe wurden die Mäuse getötet und der proximale Teil des Dünndarms wurde zur RNA-Isolation entnommen. Die Menge der jeweiligen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Anschließend wurde zur Veranschaulichung einer eventuellen Verschiebung des Zytokingleichgewichtes der Quotient aus dem Th1 Zytokin IFN- $\gamma$  und den Th2 Zytokinen IL-10 bzw. TGF- $\beta$  errechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung dieses Quotienten bei 6 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) oder  $p < 0,001$  (\*\*\*) .

Ebenso wird durch Quotientenbildung von IFN- $\gamma$  mRNA und TGF- $\beta$  mRNA der PbCl<sub>2</sub>-Einfluß dargestellt: Bei NOD-Mäusen findet eine tendenzielle Th1-Verschiebung statt (Abb. 16). Die Auswirkung der oralen Toleranz ist auch hier als tendenzielle Th2 -Verschiebung bei beiden Stämmen erkennbar (Abb. 16).

PbCl<sub>2</sub>-Exposition hat anscheinend einen deutlich stärkeren Einfluß auf das Immunsystem von NOD- als auf das von C57BL/6-Mäusen.

Die absoluten Werte zum natürlichen Zytokinverlauf (erste Versuchsreihe), bzw. dem Versuch zur oralen Toleranz mit subkutaner Bleibehandlung (zweite Versuchsreihe), sind aus methodischen Gründen nicht direkt vergleichbar.

1. Die Mäuse der zweiten Versuchsreihe waren aufgrund des Versuchsaufbaus nicht exakt gleichaltrig wie die der ersten.
2. Bei der zweiten Versuchsreihe wurde die Auswertung der PCR mit radioaktiver Markierung der Banden durchgeführt, während für die erste Versuchsreihe die Markierung mit Ethidiumbromid und Auswertung der Banden im Lumi-Imager erfolgte.

Damit ergaben sich unterschiedliche Signalintensitäten in Abhängigkeit von der vorliegenden mRNA-Menge.

## 9.1 Modulation der OVA-spezifischen Immunreaktion von Milz-T-Zellen durch $\text{PbCl}_2$ bei NOD-Mäusen

Da  $\text{PbCl}_2$ , wie oben gezeigt, das Zytokinmuster im Darm von NOD-Mäusen verändert, war es nun interessant festzustellen, ob dies auf zellulärer Ebene, z.B. der der T-Zellen, Auswirkungen auf die orale Toleranz hat. Der Mechanismus der T-Zellen Rezirkulation und das Auftreten von „Bystander Suppression“ [63, 64, 65, 66, 67, 68] lassen vermuten, daß es auch hier zu Veränderungen kommt. Um darüber Aufschluß zu erhalten, wurden *in vitro* Experimente mit Milz-T-Zellen durchgeführt.

Die NOD-Mäuse erhielten orales OVA mit bzw. ohne zusätzliche subkutan  $\text{PbCl}_2$ -Gabe oder blieben unbehandelt. Im Anschluß an diese Behandlung wurden sie mit OVA immunisiert und die Milz-T-Zellen auf ihre Reaktivität gegen dieses Antigen getestet.

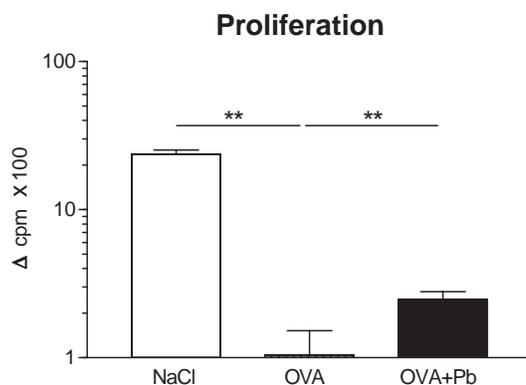


Abbildung 17: Proliferationsrate der Milz-T-Lymphozyten von NOD-Mäusen als Antwort auf die Exposition mit OVA

Die 5 bis 6 Wochen alten Mäuse blieben unbehandelt (weiß), wurden oral gegen OVA immunisiert (gestreift) oder zusätzlich zur oralen Immunisierung mit OVA subkutan mit  $\text{PbCl}_2$  behandelt (schwarz), wie bereits beschrieben. Zwei Tage nach der letzten oralen OVA-Behandlung wurden die Mäuse mit OVA in CFA immunisiert. Acht Tage später wurde die Milz entfernt und die T-Zellen daraus isoliert. *In vitro* wurde die Proliferationsrate der T-Lymphozyten als Antwort auf die Exposition mit OVA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gemessen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von sechs T-Zellkulturen aus drei Mäusen pro Gruppe. Die Werte sind angegeben in  $\Delta\text{CPM}$  (counts per minute) nach Inkorporation von radioaktivem Thymidin. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*) bzw.  $p < 0,01$  (\*\*).

Die T-Zellen der unbehandelten Mäuse (weiß) proliferierten bei OVA-Restimulation ungefähr 20-fach stärker als die T-Zellen der für OVA oral toleranten Mäuse (gestreift). Zusätzliche  $\text{PbCl}_2$ -Behandlung (schwarz) bewirkte eine Abschwächung der Toleranz, d.h. sie führte zu verstärkter Proliferation verglichen mit der für OVA toleranten Gruppe (Abb. 17).

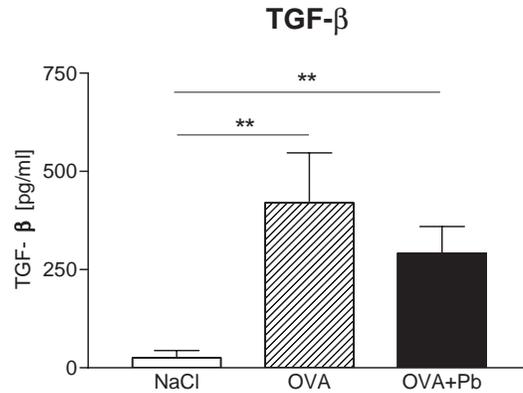


Abbildung 18: TGF- $\beta$  Sekretion der Milz-T-Lymphozyten als Reaktion auf OVA-Exposition

Die 5 bis 6 Wochen alten Mäuse blieben unbehandelt (weiß), wurden oral gegen OVA immunisiert (gestreift) oder zusätzlich zur oralen Immunisierung mit OVA subkutan mit  $PbCl_2$  behandelt (schwarz), wie bereits beschrieben. Zwei Tage nach der letzten oralen OVA-Behandlung wurden die Mäuse mit OVA in CFA immunisiert. Acht Tage später wurde die Milz entfernt und die T-Zellen daraus isoliert. Die Werte für die TGF- $\beta$  Sekretion der Milz-T-Lymphozyten als Reaktion auf 3-tägige OVA-Exposition ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) *in vitro* sind Mittelwerte plus Standardabweichung der Zellüberstände dreier Kulturen gepoolter T-Zellen der drei Gruppen, die durch ELISA ermittelt wurden. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*) bzw.  $p < 0,01$  (\*\*).

Mit der stark reduzierten Proliferationsrate in der OVA-toleranten Gruppe einhergehend kam es zu einem etwa 15-fachen Anstieg der TGF- $\beta$  Sekretion in die Zellüberstände als Antwort auf die OVA-Restimulation *in vitro* verglichen mit den nicht toleranten Mäusen (Abb. 18). Durch zusätzliche  $PbCl_2$ -Behandlung wurde die TGF- $\beta$  Sekretion zwar vermindert, jedoch war diese Reduktion nicht signifikant (Abb. 18).

## 9.2 Modulationen auf Antikörperebene

Anschließend wurde der Versuch unternommen, auch auf Antikörperebene die durch orale Toleranz und  $PbCl_2$  ausgelösten Immunmodulationen nachzuweisen. Über zwei Wochen hinweg erhielten die NOD- bzw. C57BL/6-Mäuse am 1., 3., 6., 8., 10. und 13. Tag je eine Injektion von  $10 \mu\text{g}$   $PbCl_2$  in  $100 \mu\text{l}$  NaCl-Lösung ( $0,5 \text{ mg/kgKG}$ ) in den Schwanzansatz. Eine zweite Gruppe erhielt in der gleichen Zeit Injektionen des entsprechenden Volumens NaCl-Lösung ohne weitere Zusätze. Den Tieren beider Gruppen wurde am 8., 10. und 13. Behandlungstag je  $5 \text{ mg}$  OVA in  $100 \mu\text{l}$  NaCl-Lösung oral zugeführt. Eine dritte Gruppe Tiere blieb unbehandelt.

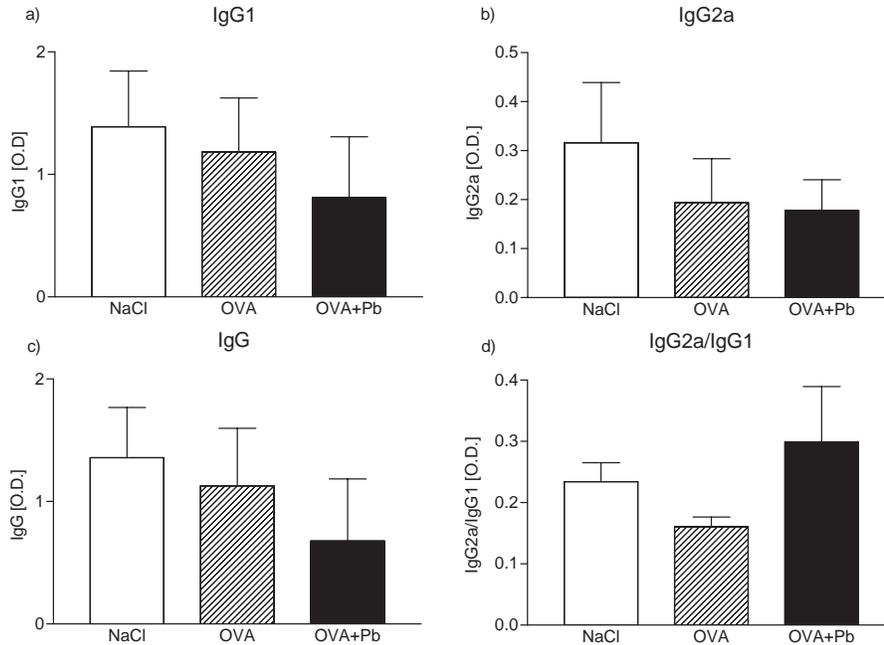


Abbildung 19: Antikörper ELISA des Serums von NOD-Mäusen

Die 5 bis 6 Wochen alten NOD-Mäuse blieben unbehandelt (weiß), wurden mit OVA oral behandelt (gestreift) oder zusätzlich dazu mit subkutan  $PbCl_2$  (schwarz). Vor der Tötung wurde den Tieren unter Ätherbetäubung Blut entnommen und später das Serum mittels ELISA auf Antikörper untersucht. Angegeben ist der Mittelwert von 6 Tieren pro Gruppe plus Standardabweichung in Optischer Dichte [O.D.].

Bei NOD-Mäusen war tendenziell eine durch OT-Induktion hervorgerufene Verminderung der Produktion aller getesteter Antikörper zu erkennen (Abb. 19a-c). Ähnlich den Vorgängen auf Zytokinebene ist auch auf Antikörperebene durch die Induktion der oralen Toleranz eine Verschiebung des Th1/Th2 Gleichgewichtes in Richtung Th2 angedeutet, was am Verhältnis von IgG2a zu IgG1 erkennbar ist (Abb. 19d). Die Verschiebung wurde durch zusätzliche  $PbCl_2$ -Gabe unterdrückt (Abb. 19d). Diese Befunde zeigen den Trend der systemischen Wirkung von  $PbCl_2$ , die auch auf zellulärer- und Zytokinebene erkennbar war (Abb. 15,16,18); sie sind jedoch nicht signifikant.

## 10 Effekte einer oralen Behandlung mit $PbCl_2$ auf die orale Toleranz bei 10 Wochen alten NOD-Mäusen

In den bisherigen Versuchen wurde die Wirkung von subkutan injiziertem  $PbCl_2$  untersucht. Da Verbindungen, die dieses Schwermetall enthalten, von Menschen in der Regel mit der Nahrung bzw. mit kontaminiertem Trinkwasser aufgenommen werden, wurde das Mausmodell herangezogen, um die Wirkungen von oral zugeführtem  $PbCl_2$  mit den Wirkungen von subkutan appliziertem zu vergleichen.

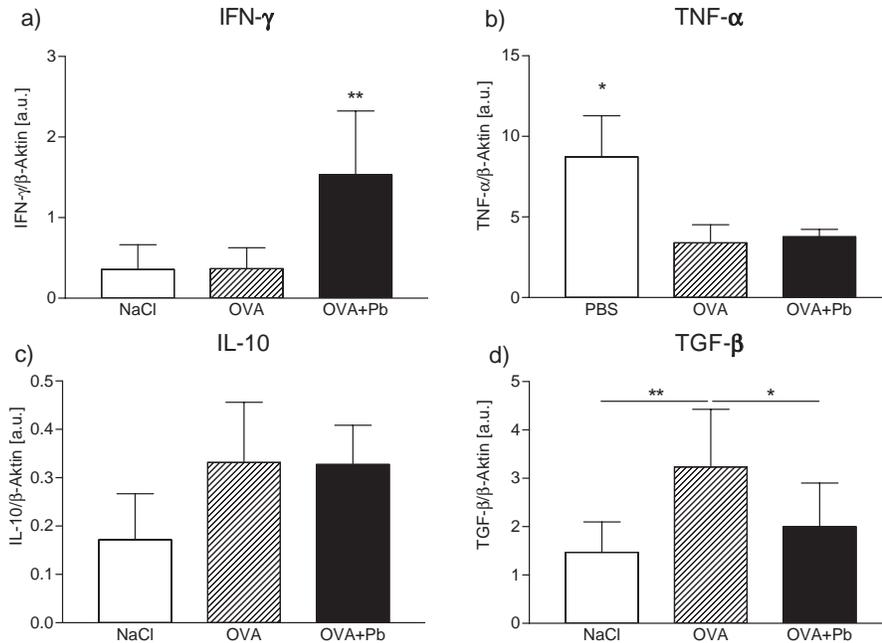


Abbildung 20: Effekte oraler  $PbCl_2$ -Exposition auf orale Toleranz gemessen an der Zytokingenexpression im Dünndarm von NOD-Mäusen

Die 9 Wochen alten NOD-Mäuse erhielten entweder NaCl (weiß) oder 1 mg OVA oral jeden zweiten Tag über 10 Tage (gestreift), die dritte Gruppe erhielt abwechselnd OVA oral und 5 Dosen von je  $100\mu l$   $10mM$   $PbCl_2$  über 10 Tage (schwarz). Acht Tage nach der letzten Behandlung wurden Dünndarmgewebeproben auf die Zytokin mRNA-Menge analysiert und an der  $\beta$ -Aktin-mRNA-Menge normiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung bei 6 Tieren pro Gruppe als a.u. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

Während die IFN- $\gamma$  Expression durch Gabe von OVA weitgehend unbeeinflusst blieb (Abb. 20a), fand sich TNF- $\alpha$  bei oraler Toleranz im Darm in verminderter Menge (Abb. 20b). Weiterhin ist in dieser Tiergruppe eine Verstärkung der IL-10 und TGF- $\beta$  Expression erkennbar (Abb. 20c, d), bei TGF- $\beta$  ist diese signifikant.

Das die hier untersuchten Tiere 10 Wochen alt waren, erklärt die relativ hohe Menge an TNF- $\alpha$ , die bei den unbehandelten Tieren nachweisbar ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen zu dem natürlichen Verlauf der Zytokingenexpression überein (Abb. 4).

Bei den zusätzlich mit Blei behandelten Tieren war ein signifikanter Anstieg des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  (Abb. 20a) sowie ein signifikanter Rückgang der TGF- $\beta$  Produktion (Abb. 20d) zu beobachten, während IL-10 und TNF- $\alpha$  relativ unbeeinflusst blieben. Dies führte zu einer deutlichen Erhöhung der IFN- $\gamma$ /Th2 bzw. Th3 Ratio, wodurch eine Verlagerung der Immunantwort nach Th1 verdeutlicht wurde (Abb. 21 a, b). Auf die TNF- $\alpha$  Expression im Darm scheint  $PbCl_2$  keine Auswirkungen zu haben (Abb. 20 b).

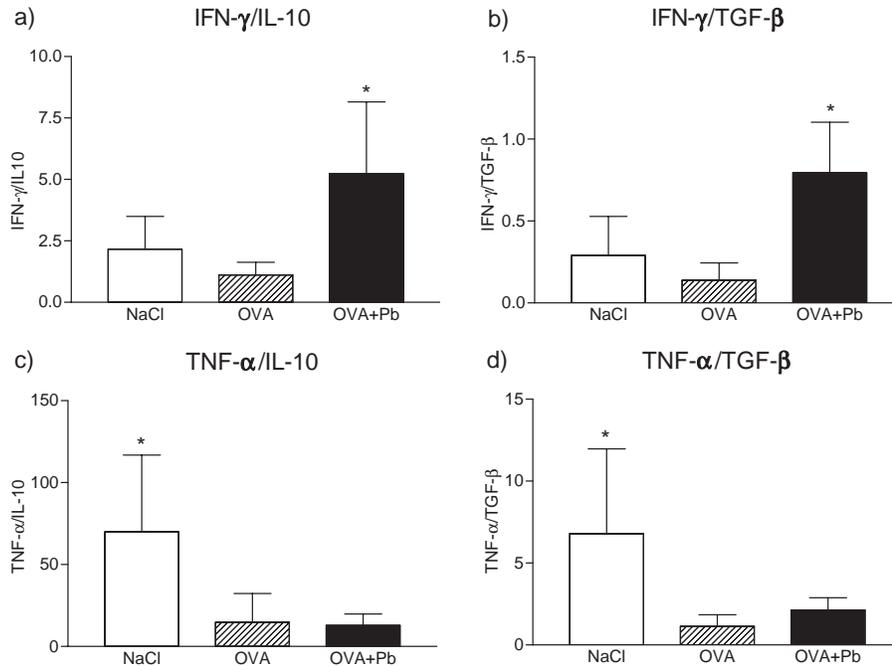


Abbildung 21: Verschiebung des Verhältnisses von Th1 zu Th2-Zytokinen durch orale PbCl<sub>2</sub>- Behandlung

Die 9 Wochen alten NOD-Mäuse erhielten entweder NaCl (weiß) oder 1 mg OVA oral jeden zweiten Tag über 10 Tage (gestreift), die dritte Gruppe erhielt abwechselnd OVA oral und 5 Dosen von je 100 $\mu$ l 10mM PbCl<sub>2</sub> über 10 Tage (schwarz). Die Menge der jeweiligen mRNA wurde auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Anschließend wurde zur Veranschaulichung einer eventuellen Verschiebung des Zytokingleichgewichtes der Quotient aus den Th1 Zytokinen IFN- $\gamma$  bzw. TNF- $\alpha$  und den Th2 Zytokinen IL-10 bzw. TGF- $\beta$  errechnet und grafisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung dieser Quotienten bei 6 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*).

Verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (weiß) wurde bei der für OVA toleranten Gruppe (gestreift) wie erwartet eine Verschiebung der Zytokinantwort in Richtung Th2 hervorgerufen (Abb. 21 a-d). Für die Quotienten aus TNF- $\alpha$  und dem jeweiligen Th2-Zytokin ist diese signifikant (Abb. 21 c,d). Bei den zusätzlich mit PbCl<sub>2</sub> oral behandelten Mäusen (schwarz) blieb die Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 gemessen an den IFN- $\gamma$  Quotienten aus (Abb. 21 a,b). Statt dessen kam es zu einem signifikanten Überwiegen der Th1 Antwort. Für den TNF- $\alpha$  Quotienten ist keine Wirkung des PbCl<sub>2</sub> zu verzeichnen (Abb. 21 c,d).

### 10.1 Effekte von PbCl<sub>2</sub> auf die Lymphozytenproliferation in peripheren Lymphknoten

In Experimenten mit subkutaner PbCl<sub>2</sub>-Gabe wurde bereits am Beispiel der Milz- T-Zellen gezeigt, daß die Behandlung systemisch auf zellulärer Ebene Auswirkungen hat. Es ist nun von Interesse, ob diese Veränderungen auf die

Milzzellen beschränkt sind, oder ob sie z.B. durch T-Zellen Rezirkulation auch in peripheren Lymphknoten nachweisbar sind. Außerdem stellte sich die Frage, ob die  $PbCl_2$ -Wirkung auf T-Zellen an die subkutane Applikation gebunden ist, oder auch über den oralen Zugangsweg vermittelt wird.

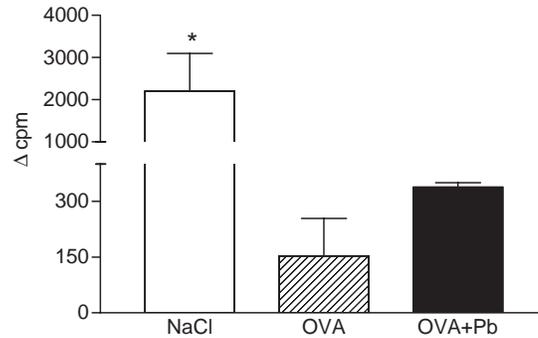


Abbildung 22: Proliferation von Lymphozyten aus Lymphknoten bei oraler Toleranz und nach oraler  $PbCl_2$  Applikation

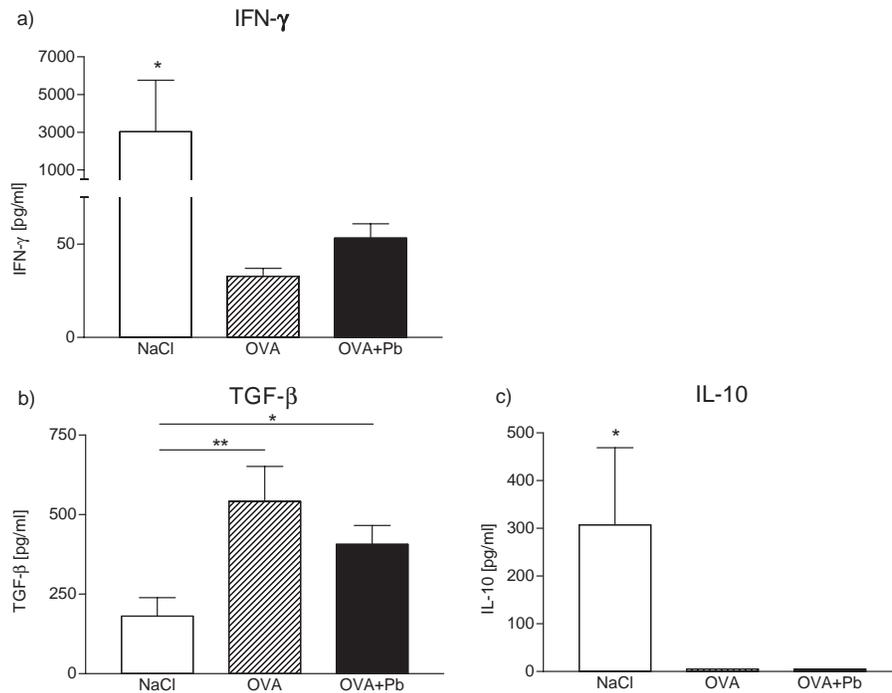


Abbildung 23: Zytokinfreisetzung in den Überstand von Lymphozyten aus Lymphknoten bei oraler Toleranz und nach oraler  $PbCl_2$  Applikation

Zu Abb. 22-23: Die NOD-Mäuse erhielten entweder NaCl (weiß) oder 1 mg OVA oral jeden zweiten Tag über 10 Tage (gestreift), die dritte Gruppe erhielt abwechselnd OVA oral und 5 Dosen von je 100  $\mu$ l 10mM  $PbCl_2$  über 10 Tage (schwarz). Zwei Tage nach der letzten oralen Gabe wurden die Mäuse aller Gruppen subkutan in die hintere Fußsohle gegen OVA immunisiert. Sieben Tage

*später wurden die poplitealen Lymphknoten entfernt und die Zellen in vitro mit OVA restimuliert. Nach 3 Tagen wurde die proliferative Antwort mittels Inkorporation radioaktivem Thymidins gemessen und die Zytokinfreisetzung in den Kulturüberständen durch ELISA bestimmt. Gezeigt werden Mittelwerte der einzelnen Gruppen á fünf Tiere plus Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).*

Entsprechend des Modells zur oralen Toleranz [54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61] proliferierten wie erwartet die Lymphknotenzellen von Tieren, die zuvor kein OVA oral (weiß) erhalten hatten, in vitro signifikant stärker als Antwort auf OVA-Exposition als die Lymphknotenzellen oral toleranter Mäuse (gestreift, Abb. 22).

Die zusätzliche  $PbCl_2$ -Behandlung während der Toleranzinduktion führte auf der Ebene der Lymphknotenzellen zu einer Reaktion, die mit den Ergebnissen der Milzzellenproliferation bei subkutaner Behandlung übereinstimmt. Es kam zu verstärkter Proliferation und damit zu abgeschwächter Toleranz (Abb. 22).

Die Überstände der Zellkulturen wurden mittels ELISA auf darin enthaltene Zytokine untersucht. Hierbei zeigte sich eine, verglichen mit den Zellen der unbehandelten Mäuse, hochsignifikant erhöhte TGF- $\beta$  Sekretion aus den Zellen der für OVA toleranten Mäuse. Durch die zusätzliche  $PbCl_2$ -Behandlung (schwarz) wurde dieser Effekt abgeschwächt (Abb. 23b).

Ein beinahe umgekehrtes Bild ergab sich bei Betrachtung des IFN- $\gamma$ . Dessen Menge war wie erwartet in den Kulturen der unbehandelten Mäuse fast 100 mal höher als bei den toleranten. Die zusätzliche Behandlung der toleranten Tiere mit  $PbCl_2$  führte zu einem Anstieg des IFN- $\gamma$  (Abb. 23a).

Bezüglich des IL-10 in den Kulturüberständen zeigte sich, daß durch die Toleranzinduktion gegen OVA die Produktion dieses Zytokins stark inhibiert wurde. Eine Veränderung dieses Effektes durch  $PbCl_2$  war nicht erkennbar, denn IL-10 blieb unter der Nachweisgrenze (Abb. 23c).

## **11 Effekte einer oralen $PbCl_2$ -Behandlung bei NOD-Mäusen ohne Toleranzinduktion**

Abschließend wurde untersucht, ob die durch eine orale  $PbCl_2$  Behandlung hervorgerufenen Effekte an eine vorherige Stimulation des Immunsystems, wie z.B. hier durch OVA, gebunden sind oder auch davon unabhängig auftreten können.

Als Versuchsgruppe dienten weibliche NOD-Mäuse, die über 10 Tage jeden 2.Tag  $PbCl_2$  oral erhalten hatten. Anschließend wurde der Zytokin-mRNA-Gehalt im Dünndarmgewebe bestimmt.

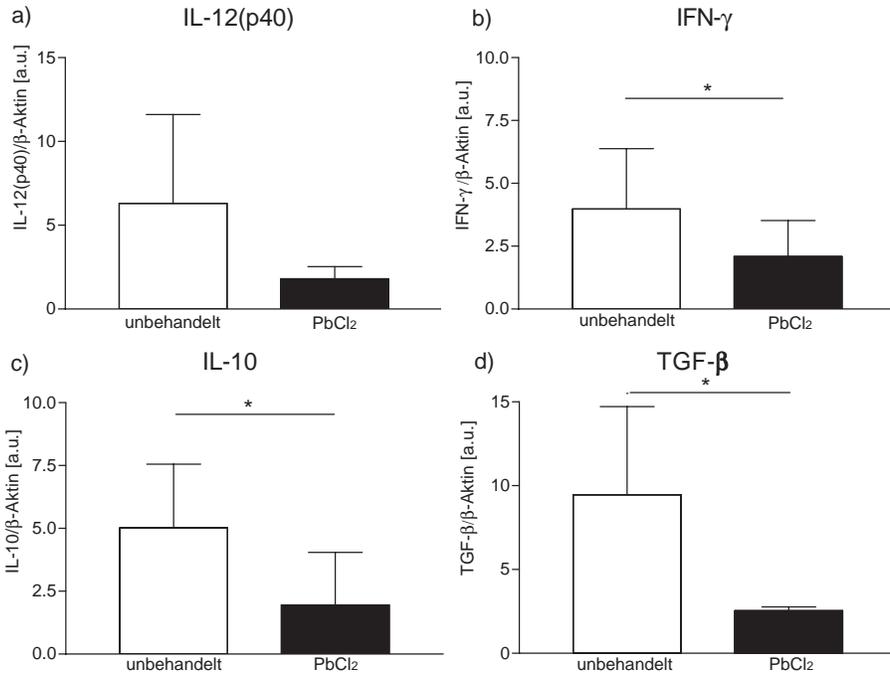


Abbildung 24: Zytokinexpression im Dünndarmgewebe von NOD-Mäusen nach oraler PbCl<sub>2</sub>-Behandlung

Die 9 Wochen alten NOD-Mäuse blieben unbehandelt (weiß) oder erhielten jeden zweiten Tag 100 µl 10 mM PbCl<sub>2</sub> oral über 10 Tage (schwarz). Nach einer Behandlungspause von 8 Tagen wurden Dünndarmgewebeproben auf Zytokin-mRNA-Expression analysiert und an der β-Aktin-mRNA-Menge normiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte plus Standardabweichung bei 6 Tieren pro Gruppe als a.u.. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*).

Die Menge des Th1 Zytokins IFN-γ (Abb. 24a) wurde durch PbCl<sub>2</sub>-Behandlung vermindert und auch IL-12p40 wurde inhibiert (Abb. 24b). Weiterhin war eine signifikante Verminderung der Th2/3 Zytokine IL-10 und TGF-β zu beobachten (Abb. 24 c,d).

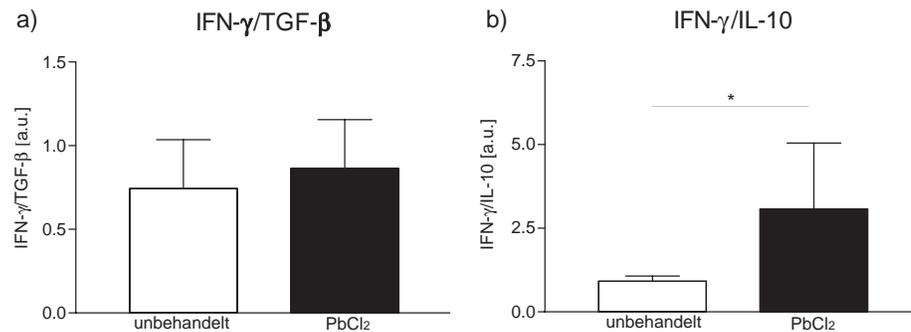


Abbildung 25: Th1/Th2-Verhältnis im Dünndarm oral mit PbCl<sub>2</sub> behandelte NOD-Mäuse

Nach Analyse der Dünndarmgewebeproben auf Zytokin-mRNA-Expression und Normierung an der β-Aktin-mRNA-Menge wurde zur Veranschaulichung

*einer eventuellen Verschiebung des Zytokingleichgewichtes der Quotient aus dem Th1 Zytokin IFN- $\gamma$  und den Th2 Zytokinen IL-10 bzw. TGF- $\beta$  errechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte der Quotienten plus Standardabweichung bei 6 Tieren pro Gruppe. Signifikante Ergebnisse sind markiert durch  $p < 0,05$  (\*).*

Die Quotienten zeigen, daß auch durch alleinige orale PbCl<sub>2</sub>- Behandlung das Zytokinverhältnis in Richtung Th1 verschoben wird. In bezug auf TGF- $\beta$  ist dies nur tendenziell der Fall (Abb. 25a), für IL-10 signifikant (Abb. 25b).

## Teil IV

# DISKUSSION

## 12 Verschiebung der Zytokinproduktion in Richtung Th1 beim Auftreten eines Diabetes Mellitus in NOD-Mäusen

In dieser Arbeit wird zum erstenmal der natürliche, altersabhängige Verlauf der Zytokingenexpression im Darm von NOD-Mäusen und C57BL/6-Mäusen auf mRNA-Ebene beschrieben. Die in den T-Helfer-Zellen gebildete Zytokin-mRNA entsteht durch Transkription aus DNA und kodiert im Rahmen der Translation für Aminosäuren, aus denen Proteine hervorgehen, in diesem Fall Zytokine. Die untersuchten Zytokine wurden nicht nur wegen ihrer Relevanz für die Diabetogenese ausgewählt, sondern auch hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Darmimmunsystem. Eine Übersicht über die Wirkung der verwendeten Zytokine gibt die Einleitung auf Seite 10. Alle wirken sich in unterschiedlicher Art und Weise sowohl auf die Diabetogenese aus, als auch auf Entzündungsvorgänge im Darm, sowie auf die orale Toleranz. Für den altersabhängigen Verlauf wurde die Hypothese geprüft, daß die Entwicklung der Zytokingenexpression im Darm von NOD-Mäusen der im Pankreas weitgehend entspricht, also beim Diabetesbeginn ein Überwiegen der Th1-Immunreaktion auftritt [26, 78, 79].

Diese Erwartungen wurden bestätigt. Beim Einsetzen der Diabetessymptomatik war die Zytokinbalance im Dünndarm der unbehandelten NOD-Mäuse in Richtung Th1 verschoben. Dies wurde hervorgerufen durch einen Anstieg der IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mRNA-Menge (im weiteren nur noch mRNA genannt) und eine Reduktion der IL-10 und TGF- $\beta$  mRNA. Die Th1 antagonisierende IL-12 Untereinheit p40 konnte nur bei frisch diabetischen Tieren in geringer Menge nachgewiesen werden.

Da C57BL/6-Mäuse nicht genetisch für Autoimmunkrankheiten prädisponiert sind, wurde vermutet, daß die Zytokinbalance bei diesen Tieren nur geringen altersbedingten Veränderungen unterliegt, und daß mangels einer inflammatorischen Reaktion keine verstärkte Th1-Neigung erkennbar ist.

Im Darmgewebe der C57BL/6-Mäuse waren in der Expression von IFN- $\gamma$ , IL-10- und TGF- $\beta$ -mRNA wie erwartet kaum Schwankungen zu erkennen, auch die Th1/Th2 bzw. Th3-Balance blieb weitgehend stabil. IL-12 p40-mRNA zeigte sich im Darm mit zunehmender Tendenz; TNF- $\alpha$  war nur in geringen Mengen vorhanden und zeigte kaum Veränderungen.

Das von Th1-Zellen gebildete, hauptsächlich proinflammatorisch wirkende IFN- $\gamma$ , führt bei lokaler, durch Transgenität vermehrter Expression in den Pankreasinseln von NOD zur vermehrten  $\beta$ -Zellen Destruktion [9, 6, 111, 133, 134, 135, 136, 74, 79]. Je nach Versuchsaufbau führt es auch zu schwerer Insulitis [137, 138]. Dies kommt wahrscheinlich durch eine über NO-Induktion vermittelte direkt  $\beta$ -Zellen toxische Wirkung zustande und durch die Fähigkeit des IFN- $\gamma$ ,  $\beta$ -Zellen für T-Zellen medierte Zytotoxizität zu sensibilisieren [221].

Eine durch die intramuskuläre Applikation eines Plasmidvektors (pCMV-IFN- $\gamma$ ) erhöhte IFN- $\gamma$  Expression führt bei NOD-Mäusen zu einem verfrühten

Diabetesbeginn [85]. Die genetische Absenz verursacht bei diesen Tieren hingegen einen verspäteten Krankheitsbeginn [30].

Das IFN- $\gamma$  beim Krankheitsbeginn im Pankreas von NOD-Mäusen vermehrt auftritt bzw. sein Anstieg zeitnah mit dem Einsetzen der  $\beta$ -Zellen destruktiven Insulitis stattfindet, wurde bereits in mehreren Arbeiten gezeigt [79, 134, 84, 86]. Dies korreliert mit den Experimenten dieser Arbeit, die zeigen, daß IFN- $\gamma$  im gleichen Zeitraum auch im Darm verstärkt exprimiert wird. Ob jedoch die vermehrte Expression dieses Zytokins die Ursache für den Krankheitsbeginn ist oder dessen Folge, ist nicht mit Sicherheit zu sagen.

Obwohl IFN- $\gamma$  zwar hauptsächlich proinflammatorisch wirkt, ist es bei systemischer Gabe auch in der Lage, einige immunsuppressive Vorgänge zu vermitteln, wie die Hemmung von Monozytenchemotaxis [139], Induktion von Suppressorzellen [231] und Induktion von T-Zellen Apoptose [140].

Aufgrund des zeitlichen Zusammenhanges zwischen Erhöhung der IFN- $\gamma$ -mRNA Expression in Darm und Pankreas und deren proinflammatorischer Wirkung auf die Pankreasinseln kann man die These aufstellen, daß eine sehr enge immunologische Beziehung zwischen den beiden Organen besteht und die Wirkung von Zytokinexpressionsveränderungen im Darm auf das Pankreasgewebe im Sinne einer lokalen Wirkung gewertet werden kann. Würde man die in der Diabetogenese auftretende INF- $\gamma$  mRNA Erhöhung im Darm als systemisches Phänomen ansehen, müßten theoretisch immunsuppressive Anteile der IFN- $\gamma$  Wirkung erkennbar sein.

IL-12 bewirkt eine erhöhte Differenzierung von T-Helfer-Zellen zu Th1 Zellen. Auf diesem Weg sorgt es für den Anstieg der IFN- $\gamma$  Expression und ist somit in der Lage, eine Immunantwort in Richtung Th1 zu verschieben [9]. Bei destruktiver Insulitis kommt es in den Pankreasinseln vermehrt vor [26]. Je nachdem, in welcher Dosierung IL-12 NOD-Mäusen systemisch appliziert wird, kann es den Krankheitsbeginn entweder beschleunigen [141] oder hinauszögern [142].

In dieser Arbeit wurde das Darmgewebe nur auf IL-12 p40 untersucht, das eine dem IL-12 p70 antagonistische Wirkung hat. Das diese Untereinheit erst bei diabetischen NOD nachweisbar war, könnte also evtl. eine Gegenregulation darstellen, um die inflammatorischen Vorgänge zurückzudrängen, oder es wird gleichzeitig auch die p35 Untereinheit exprimiert, was zur Folge hätte, daß hier nicht IL-12 p40 wirkt, sondern die biologisch aktive Form p70 seine Th1 fördernde, proinflammatorische Wirkung entfaltet [143, 144, 145, 146, 147, 148, 149]. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die vermehrte IFN- $\gamma$  Expression. Hierfür spricht, daß p35 von relativ vielen Zellen des Immunsystems gebildet werden kann, aber nur in Kombination mit p40 vorkommt. P40 hingegen kann von deutlich weniger Zellen gebildet werden [150, 151, 152, 153]. Andererseits zeigten Rea et al. [150] beim Menschen eine Zunahme des IL-12 p40 im Blut mit dem Alter. Sie schlossen daraus, daß möglicherweise eine Dysregulation der Zytokinantwort, die schon vorher bei älteren Individuen bemerkt wurde [154, 155, 156, 156], eine Erklärung hierfür sein könnte. Lymphozyten älterer Individuen scheinen stabilere RNA mit verstärkter Transkription und erhöhter Zytokinproduktion zu haben [158]. Dieses Phänomen könnte eine Erklärung für die mit dem Alter zunehmende Menge der p40 mRNA in den Därmen bei C57BL/6 sein. Das Auftreten des Zytokins bei diabetischen NOD muß also nicht unbedingt an den Krankheitsverlauf gebunden sein, sondern kann auch eine normale Alterserscheinung darstellen.

TNF- $\alpha$  wirkt synergistisch mit IL-12 auf die Th1/Th2-Balance des Immunsystems [80], fördert also, wie dieses, die Produktion von IFN- $\gamma$ . Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bekanntermaßen in der Pathogenese verschiedener T-Zellen medierter Autoimmunkrankheiten und auch des IDDM eine Rolle spielt [159, 160, 161, 162]. Wird es NOD-Mäusen bis zum Alter von ca. zwei Wochen systemisch verabreicht, kommt es zu einem vorzeitigen Krankheitsbeginn [163]; ebenso bei transgener Expression in den Pankreasinseln ganz junger Tiere [164]. Bei Tieren, die älter als vier Wochen sind, führt sowohl die systemische [165, 166] als auch die transgene lokale [167, 168] Applikation des Zytokins zu einem Hinauszögern der Krankheit, obwohl eine Insulinitis auftritt [167]. Auf welche Weise TNF- $\alpha$  hier immunsuppressiv wirkt, ist nicht geklärt. Möglicherweise fördert es T-Zellen Anergie [169].

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß bei destruktiver Insulinitis, die bei an Diabetes erkrankten NOD-Mäusen vorliegt, auch im Darmgewebe größere Mengen an TNF- $\alpha$  gebildet werden. Es ist möglich, daß diese vermehrte Expression im Darmgewebe und in anderen Arbeiten im Pankreasgewebe bei Diabetesbeginn eine Kontraregulation darstellt, die weitere inflammatorische Prozesse eindämmen soll. Da IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gegenseitig ihre Expression induzieren [80], ist es auch möglich, daß die TNF- $\alpha$  Produktion durch das beim Einsetzen des Diabetes erhöhte IFN- $\gamma$  gefördert wird. Andererseits könnte der Anstieg lediglich reaktiv wegen einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion sein. Für die starke TNF- $\alpha$  Expression bei den 10 Wochen alten NOD könnte man ähnliche Erklärungen heranziehen. Entweder beginnt bei Tieren dieses Alters die destruktive Insulinitis, oder es handelt sich um einen Gegenregulationsversuch des Immunsystems, den Körper vor übermäßigen inflammatorischen Reaktionen zu schützen.

TGF- $\beta$  ist ein Th3-Zytokin, das der Diabetogenese entgegenwirkt. Die intramuskuläre Injektion eines für TGF- $\beta$  kodierenden Plasmidvektors bewirkte in Versuchen von Piccirillo et al. [85] eine Suppression von Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ und schützte auf diese Weise NOD-Mäuse vor Insulinitis und Diabetes. Weiterhin wurde von Mueller et al. 1996 und King et al. 1998 [170, 171] gezeigt, daß TGF- $\beta$ , wenn es transgen in Pankreas  $\beta$ -Zellen exprimiert wird, vor einem Typ 1 Diabetes schützen kann und das diabetogene Potential autoreaktiver T-Zellen vermindert [171]. Möglicherweise ist es sogar in der Lage, autoreaktive T-Zellen direkt zu supprimieren [172].

Umgekehrt fördert ein Mangel an TGF- $\beta$  das Auftreten von immunologischen Krankheiten [50], und beim Beginn einer destruktiven Insulinitis konnte es im Pankreas von verschiedenen Versuchstieren nur noch in geringer Menge nachgewiesen werden [26]. Diese Arbeit zeigt, daß dies auch im Darm der Fall ist. Eine bei NOD-Mäusen physiologische Reduktion der TGF- $\beta$ - mRNA-Expression scheint also eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung zu spielen.

Das von Th2-Zellen gebildete IL-10 hat ähnliche Funktionen wie TGF- $\beta$  und inhibiert die zellmedierte Immunität [87, 35, 177, 176, 101]. Systemische Gabe von IL-10 schützt vor dem Auftreten eines Typ 1 Diabetes [136, 173]. Jedoch kam es in Experimenten mit transgener IL-10 Expression in den Pankreasinseln früher zu Insulinitis und IDDM [174, 175]. Warum das der Fall ist, ist noch nicht geklärt, jedoch ist seit einiger Zeit bekannt, daß IL-10 auch immunstimulierende Eigenschaften hat. Es fördert z.B. das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, sowie Differenzierung und Zytotoxizität von CD8+ Zellen [178, 179, 180].

Außerdem wirkt es unterstützend in der Proliferation von Thymozyten und Mastzellen [181].

Bei destruktiver Insulinitis wird IL-10 sowohl in Pankreasgewebe [89] als auch in Darmgewebe vermindert exprimiert. Bei 5 Wochen alten NOD wird signifikant mehr IL-10 im Darmgewebe exprimiert als bei diabetischen. Die Menge ist insgesamt mit dem Alter abnehmend (Abb. 2) und in jeder Altersstufe deutlich höher als bei C57BL/6. Aufgrund der für dieses Zytokin bekannten Wirkungen könnte man vermuten, daß die im jugendlichen Alter hohe Expression von IL-10 das Auftreten der Insulinitis vorantreibt, die schließlich zeitnah mit der vermehrten Expression der Th1-Zytokine in einen Diabetes mündet.

In den Untersuchungen zur Zytokin mRNA-Expression im Darm der NOD-Mäuse findet man bezüglich der gegenseitigen Beeinflussung der Zytokinklassen einiges bestätigt, was bisher zur Kreuzregulation bekannt ist. Th1-Zytokine hemmen Th2 und Th3 und umgekehrt, während Th1 Zytokine auf ihre Ursprungszellen verstärkend wirken und Th2- und Th3-Zytokine auf eigene Zellen und gegenseitig fördernd wirken [33, 34, 35, 36]. Im Verlauf von IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bei NOD sieht man, daß zum großen Teil IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -mRNA in geringer Menge vorhanden ist solange viel IL-10 und TGF- $\beta$ -mRNA gemessen wird. Mit der Reduktion dieser beiden kommt die von Th1-Zellen gebildete Zytokin mRNA vermehrt vor. In welche Richtung hier die Beeinflussung geht, ob also Th1 Th2 hemmt, oder zuerst Th2 Zytokine vermindert exprimiert werden und daraus die Th1 mRNA Vermehrung resultiert, ist aus diesen Ergebnissen nicht ersichtlich. Die hohe TNF- $\alpha$ -mRNA-Menge bei den 10 Wochen alten Tieren ist möglicherweise reaktiv wegen einer beginnenden Insulinitis. Anschließend sinkt die Menge wieder, was durch die noch hohen IL-10 und TGF- $\beta$ -mRNA-Mengen bedingt sein könnte.

Zusammenfassend läßt sich aussagen, daß die Zytokinexpression in den Därmen unbehandelter diabetischer NOD-Mäuse der in der Literatur beschriebenen im Pankreasgewebe, wie im Vorhergehenden beschrieben, in etwa entspricht [134, 79, 84, 86, 26, 89]. Wahrscheinlich steht das Darmimmunsystem in engem Zusammenhang mit den immunologischen Vorgängen, die im Pankreas zur Auslösung eines Diabetes beitragen. Andere Hinweise hierfür, wie das bevorzugte Auftreten eines Diabetes bei Verfütterung bestimmter Getreidesorten an Mäuse, oder Kuhmilch an Menschen, sowie eine insgesamt gesteigerte Reaktivität des Immunsystems gegen Nahrungsmittelantigene beschreiben auch z.B. Scott et al., Karjalainen et al., Hoorfar et al. und Kolb et al. [51, 182, 183, 184, 185, 186, 52]. Dies untermauert die Vermutung, daß über eine Modulation des Darmimmunsystems der Krankheitsverlauf des Diabetes beeinflusst werden kann. Ein Standardrezept dafür, wann und in welche Richtung diese Modulation stattfinden sollte, kann es jedoch nicht geben, da sich je nach Alter des behandelten Individuums und in Abhängigkeit vom Wirkort wie oben beschrieben die Zytokinwirkung ändern kann.

Weiterhin handelt es sich bei der entweder altersbedingten oder diabetesassoziierten Erhöhung der Th1-Zytokine, sowie bei der Reduktion von TGF- $\beta$  und IL-10 um eine Eigenart der NOD-Mäuse, die bei dem Vergleichsstamm C57BL/6 nicht auftritt. Hier wird gezeigt, daß sich die Neigung des Immunsystems der NOD-Mäuse mehr in Richtung der eher zellvermittelten proinflammatorischen Th1-Antwort verschiebt, während die des Vergleichsstammes erwartungsgemäß ausgeglichen bleibt.

### 13 Veränderung des Zytokinmusters im Darmgewebe von NOD- Mäusen durch Antigenkontakt

IL-10, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  sind wesentlich an der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichtes im Darm beteiligt und regulieren wechselseitig ihre Expression (vergleiche Seite 10). Daher galt ihnen das Hauptinteresse.

Als Antwort auf orale Exposition mit OVA zur oralen Toleranzinduktion kam es sowohl in NOD-Mäusen als auch in C57BL/6 Mäusen zu einem Anstieg von IL-10 und TGF- $\beta$  auf mRNA-Ebene, während IFN- $\gamma$  größtenteils unbeeinflusst blieb (Abb. 12-14). Diese Veränderung in Richtung verstärkter Th2/Th3 Expression wurde auch von Chen et al. 1995 [232] beschrieben. Als Antwort auf niedrig dosierte orale Gabe von MBP (Myelin Basic Protein) bei SJL/J Mäusen sahen sie eine supprimierte Th1 Reaktion mit deutlich vermehrten IL-10 und TGF- $\beta$  Werten. Nach zusätzlicher intraperitonealer Immunisierung mit MBP war die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$  weiter verstärkt. Weiner et al. [187] fanden einen ähnlichen Effekt in den Payerschen Plaques nach einer einmaligen Fütterung mit einer niedrigen Dosis OVA. Immunhistochemische Untersuchungen des GALT (Gut Associated Lymphatic Tissue) zeigten nach multipler hochdosierter OVA-Gabe eine verstärkte TGF- $\beta$  und IL-10 Expression [187]. Xu-Amano et al. [188] sahen nach oraler Immunisierung mit Schaferthrombozyten in den Payerschen Plaques vorwiegend Th2 Zellen, was auf die vermehrte Expression von IL-10 und TGF- $\beta$  hindeutet. Da die derartige Veränderung der Zytokinexpression bei allen oral zugeführten Antigenen ähnlich war, kann man sie als antigenunspezifische Reaktion des Darmimmunsystems werten, die anscheinend auch in den unterschiedlichen Anteilen des GALT ähnlich ist. Man kann diese Reaktion als ein Zeichen der oralen Toleranz werten.

Die überwiegend Th2/Th3 lastige Reaktion des Darmimmunsystems auf Antigenreiz hin oder als Reaktion auf verschiedene im Darm ansässige Bakterien, gehört zu den essentiellen Mechanismen zur Vermeidung von Th1 assoziierten Entzündungsreaktionen [92, 93]. Es wurde beschrieben, daß ein Übergewicht von Th1 Zytokinen wie z.B. IFN- $\gamma$  oder solchen, die zur verstärkten Expression dieser Zytokine führen, z.B. IL-12, inflammatorische Vorgänge im Darm induzieren und zu einer Abschwächung der oralen Toleranz führen [94, 34]. Bisher ist es noch nicht gelungen herauszufinden, welcher Teil des Darmimmunsystems für die entsprechenden Reaktionen verantwortlich ist [95].

Welche Zellen hauptsächlich beteiligt sind, ist ebenfalls noch nicht bekannt; es wird aber vermutet, daß sowohl dendritische Zellen als auch Enterozyten eine entscheidende Rolle spielen [96, 99].

In der zweiten Versuchsreihe zur oralen Toleranz an Tieren des NOD-Stammes (Abb. 20) konnten die oben beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden. TNF- $\alpha$ -mRNA war im Vergleich zu unbehandelten Mäusen reduziert. Sowohl TNF- $\alpha$  als auch IFN- $\gamma$  sind bei inflammatorischen Prozessen in der Darmschleimhaut in größerer Menge nachweisbar [48].

Als antigenspezifische Reaktion ist die in Abbildung 17 und 22 beobachtete Einschränkung der Proliferation von Splenozyten bzw. Lymphknotenzellen aus für OVA oral toleranten Tieren nach Immunisierung mit OVA zu sehen, sowie der Anstieg des TGF- $\beta$  in den Kulturüberständen (Abb. 18 u. 23b). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Toleranz auf ein oral zugeführtes Antigen nicht auf den

Gastro-Intestinaltrakt beschränkt ist, sondern auch in der Peripherie wirksam wird. Gemeinsam mit einer Reduktion des IFN- $\gamma$  (Abb. 23a, gestreifter Balken) kommt es hier im Rahmen der antigenspezifischen Reaktion der Lymphknoten-zellen ebenso zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th2 wie im Darmgewebe als antigenunspezifische Reaktion.

IL-10 ist in den Überständen von Lymphknoten-zellen toleranter Mäuse kaum nachweisbar gewesen. Es besteht daher Grund zu der Annahme, daß dieses Zytokin zwar im Darm eine wichtige regulatorische Rolle im Sinne der Inhibition der Th1-Antwort und damit zur Entzündungsprotektion spielt, aber nicht in der Peripherie.

Von Miller et al., 1991 [100] wurde gezeigt, daß die peripheren Effekte der oralen Toleranz wahrscheinlich durch TGF- $\beta$  vermittelt werden. In Tieren, die mit OVA gefüttert wurden und nach einer Immunisierung mit Myelin Basic Protein (MBP)/complete Freund's adjuvant (CFA) mit einer OVA-Injektion in die Fußsohle restimuliert wurden, kam es zu einer Suppression der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE). Diese Suppression wurde von OVA-spezifischen regulatorischen Zellen vermittelt, die in die drainierenden Lymphknoten eingewandert waren und TGF- $\beta$  sezernierten. Auch hier spielte IL-10 anscheinend keine Rolle.

Die antigenspezifische Antikörperproduktion gegen OVA bei mit OVA immunisierten NOD, IgG1, IgG2a und IgG wurde durch orale Toleranzinduktion kaum verändert. Es war nur eine leichte tendenzielle Verminderung der drei Antikörper zu beobachten. Das Immungleichgewicht wurde aber tendenziell in Richtung des Th2 assoziierten Antikörpers IgG1 verschoben. Die Verminderung des Th1 assoziierten Antikörpers IgG2a war also anscheinend ausgeprägter als die von IgG1. Dies unterstützt für NOD die bisherigen Aussagen über die Veränderungen auf mRNA- und zellulärer Ebene. Melamed et al. 1994 und Mowat et al. 1996 [189, 190] fanden übereinstimmend hierzu, daß IgG1 Antworten gegenüber OT-Induktion resistenter sind als IgG2a Antworten.

## 14 Modulation des Immunsystems von NOD-Mäusen durch PbCl<sub>2</sub>

### 14.1 Subkutane PbCl<sub>2</sub> Applikation

Durch PbCl<sub>2</sub>-Exposition der zum Zeitpunkt der Untersuchung 10 Wochen alten Mäuse über den subkutanen Zugangsweg während oraler Toleranzinduktion wurde ein Unterschied in der Reaktion des Darmimmunsystems von NOD-Mäusen zu C57BL/6 Mäusen herausgestellt. Die Mäuse erhielten 6 x 10  $\mu$ g gelöstes PbCl<sub>2</sub> s.c..

Während PbCl<sub>2</sub> auf die antigenunspezifische Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  bei der NOD-Maus hemmend wirkte, also einen Shift in Richtung Th1 hervorrief, waren bei C57BL/6 solche Auswirkungen nicht zu beobachten. Eine Veränderung der IFN- $\gamma$  Expression war in keinem der Mausstämmen als Reaktion auf PbCl<sub>2</sub> zu sehen, dennoch führte der Mangel an Th2 und Th3 Zytokinen bei NOD zu einer Abschwächung der OT.

Dies kann aus den Messungen der erhöhten antigenspezifischen Proliferation (Abb. 17, 22) und der verminderten TGF- $\beta$  Sekretion der Milzzellen (Abb. 18) und Lymphknoten-zellen (Abb. 23) in Gegenwart von PbCl<sub>2</sub> abgeleitet werden.

Auch auf die Antikörperproduktion übt  $\text{PbCl}_2$  bei NOD-Mäusen eine modulierende Wirkung aus (Abb. 19). Die Titer der untersuchten Antikörper gegen OVA waren durch  $\text{PbCl}_2$  leicht reduziert. Das Verhältnis von Th1/Th2 tendierte in Übereinstimmung mit den antigenunspezifischen Zytokinmessungen im Darm eher zu Th1. Ein Überwiegen der Th1 Immunantwort wirkt sich meist hemmend auf die Proliferation von B-Zellen und damit auf die Antikörperproduktion aus [101]. Dies könnte die leichte Antikörperreduktion erklären.

Bisherige Studien über die immunmodulatorischen Effekte von Blei wurden meist an Milzzellen von BALB/c und OVA-transgener Mäuse durchgeführt [103, 102, 42]. Bei diesen Mausstämmen wurde ein genau umgekehrter Bleieinfluß auf das Immungleichgewicht beobachtet. Bei BALB/c wurde antigenunabhängig durch subkutane  $\text{PbCl}_2$ -Gabe anhand von Milz-T-Zellen mit Durchflußzytometrie festgestellt, daß die Immunantwort in Richtung Th2 verlagert wurde. Bei OVA-transgenen Mäusen ließ sich der gleiche Effekt beobachten, allerdings nur nach Immunisierung mit OVA. Anhand von Zytokinuntersuchungen in Kulturüberständen in denen IL-4 nach Bleibehandlung vorherrschend war und auch auf Antikörperebene im Serum konnten diese Ergebnisse bestätigt werden [102, 42, 103]. Insgesamt sind für BALB/c-Mäuse eine Reihe verschiedener Immunantworten bekannt, die eine starke Verschiebung des immunologischen Gleichgewichtes in Richtung Th2 gemeinsam haben [101, 35, 33].

Weiterhin wurde postuliert, daß Blei über eine verstärkte Adenylatzyklaseaktivität den cAMP-Spiegel erhöht, was zu einer Inhibierung der Th1 Immunantwort führt [43]. Blei vermittelt also wahrscheinlich bei BALB/c über direkte Hemmung der Th1-Zellen und Stimulation der Th2-Zellen seine immunmodulierende Wirkung. Dies kann sowohl auf der Ebene der reifen T-Helfer Zellen geschehen, als auch über deren Vorläuferzellen [43]. Die Bleieffekte setzten mehr bei der Zelldifferenzierung an als bei der Proliferation, denn die Lymphozytenreaktivität wird verstärkt, ohne deren Lebensfähigkeit oder die Zellzahl stark zu beeinflussen [47].

Diese von Stamm zu Stamm unterschiedlichen Ergebnisse weisen darauf hin, daß der genetische Hintergrund eines Individuums wahrscheinlich entscheidend für die immunmodulatorischen Effekte von  $\text{PbCl}_2$  ist. Die Ergebnisse von Lawrence et al. und Heo et al. [43, 47, 42, 101, 102] zusammengenommen mit denen dieser Arbeit zeigen, daß  $\text{PbCl}_2$  unter anderem in die Differenzierung von T-Zellen eingreift und über diesen Weg die Zytokinproduktion beeinflusst. Je nach genetischer Prädisposition kann eine Verschiebung in Richtung Th1 oder Th2 ausgelöst werden. Möglicherweise kann man daraus auch schließen, daß die Effekte von  $\text{PbCl}_2$  zusätzlich vom Wirkort abhängen und je nach tangiertem Zelltyp eine unterschiedliche Reaktion hervorgerufen werden kann, wobei es eine wichtige Rolle spielt, ob das Immunsystem des betreffenden Individuums gesund ist oder z.B. für immunologische Krankheiten prädisponiert ist.

Das Immunsystem der NOD-Maus und des C57BL/6 Stammes bevorzugt im Gegensatz zu BALB/c normalerweise den Reaktionsweg zu Th1 [31, 32, 101, 104]. Bei NOD-Mäusen war das Umwelttoxin  $\text{PbCl}_2$  in der Lage, eine Modulation der Immunreaktion hervorzurufen, bei C57BL/6 im hier angewendeten Versuchsaufbau jedoch kaum. Es ist somit wahrscheinlich, daß der genetische Hintergrund eines Individuums nicht nur die Richtung der Immunantwort bestimmt, sondern auch die Suszeptibilität für immunmodulierende Agenzien. Das für eine Autoimmunkrankheit prädisponierte Immunsystem der NOD-Mäuse

reagiert vergleichsweise stark auf die Noxe  $\text{PbCl}_2$ . C57BL/6 Mäuse, die nicht derartig genetisch prädisponiert sind, weisen eine geringere Empfindlichkeit auf.

## 14.2 Direkte Immunmodulation des Darmimmunsystems durch orale $\text{PbCl}_2$ -Behandlung

Die Mäuse erhielten 5 x 100  $\mu\text{l}$  einer 10mM  $\text{PbCl}_2$ -Lösung oral. Da durch orale  $\text{PbCl}_2$ -Gabe das Darmimmunsystem direkt gegen  $\text{PbCl}_2$  exponiert wird, ist es interessant zu beobachten, ob sich die Reaktion auf das oral zugeführte Schwermetall von anderen Applikationsformen, z.B. der vorher untersuchten subkutanen, unterscheidet. Die oral mit  $\text{PbCl}_2$  behandelten für OVA oral toleranten Mäuse sind im Alter von 10 Wochen untersucht worden. Das ist ca. einen Monat vor Auftreten einer Diabetessymptomatik. Hierdurch kann man möglicherweise Hinweise darauf erhalten, ob durch Umwelttoxine das Krankheitsgeschehen beeinflusst werden kann.

Die Ergebnisse der oralen  $\text{PbCl}_2$ -Behandlung (Abb. 20, 21) gleichen vom Prinzip her denen der subkutanen Behandlung, das heißt, die Th1/Th2-Balance ist auch in diesem Fall in Richtung Th1 verschoben. Die Ergebnisse unterscheiden sich insofern, als daß durch die orale  $\text{PbCl}_2$ -Behandlung in der auf Zytokinebene stattfindenden antigenunspezifischen Reaktion keine signifikante Verminderung der IL-10 Produktion induziert, jedoch TGF- $\beta$  stark inhibiert wurde. Weiterhin kam es zu einer signifikant verstärkten IFN- $\gamma$  Expression.

Die Reduktion des TGF- $\beta$  kann entweder ein direkter Bleieffekt durch Affektion von Th2/3 Lymphozyten sein oder sekundär durch die Erhöhung des IFN- $\gamma$  zustande kommen, da die Zytokine einer gegenseitigen negativen Rückkopplung unterliegen [33]. Ein proinflammatorischer  $\text{PbCl}_2$ -Effekt wird durch die verstärkte Expression von TNF- $\alpha$  gezeigt, das zusätzlich über seine mit IL-12 synergistische Wirkung die IFN- $\gamma$  Produktion und damit das Th1-Übergewicht fördert.

Als antigenspezifische Reaktion zeigte die Immunisierung der betroffenen Tiere mit OVA, daß die orale Toleranz in mit  $\text{PbCl}_2$  behandelten Tieren abgeschwächt war (Abb. 22, 23). Die Lymphknotenzellen dieser Tiere proliferierten bei Exposition der Zellen mit OVA in vitro wesentlich stärker als die der nicht mit  $\text{PbCl}_2$  behandelten oral toleranten Tiere (Abb. 22). Mit dieser Beobachtung übereinstimmend ist, daß das Zytokinmuster in den Überständen der Lymphknotenzellen erhöhte IFN- $\gamma$  Werte und erniedrigte TGF- $\beta$  Werte zeigte (Abb. 23a, 23b). IL-10 scheint auch im Rahmen der oral induzierten  $\text{PbCl}_2$ -Effekte in der Peripherie von eher untergeordneter Bedeutung zu sein (Abb. 23c).

Diese Ergebnisse passen zu den bisherigen Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, daß orale Toleranzinduktion durch verschiedene Nahrungsmittelzusätze beeinflusst werden kann [191, 105, 108]. In diesen wurde beschrieben, daß Bakterientoxine mit nachgewiesenem immunmodulatorischen Potenzial, z.B. von E.coli oder Cholera Toxin, nicht nur den Mechanismus der oralen Toleranz beeinflussten, sondern über diesen Weg auch in die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten wie Diabetes Mellitus oder der EAE eingriffen.

### 14.3 Orale PbCl<sub>2</sub>-Behandlung ohne gleichzeitigen Antigenkontakt

Die ausschließlich mit PbCl<sub>2</sub> oral behandelten Mäuse zeigten eine verminderte Expression aller getesteten Zytokine, wobei das Immungleichgewicht in Richtung Th1 verschoben wurde (Abb. 24, 25). Bei NOD sind die Bleieffekte bei oraler Gabe der Schwermetallösung, also auch ohne vorherige Gabe eines Antigens, auslösbar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Immunmodulation durch subkutane PbCl<sub>2</sub>-Behandlung beim NOD-Stamm eher durch eine Abnahme der Th2/3 Antwort zustande kommt, bei oraler jedoch eine signifikante Zunahme des IFN- $\gamma$  zu erkennen ist. Dies gibt Grund zu der Annahme, daß die Neigung der am GALT beteiligten Zellen zu einer Th1 gewichtete Immunantwort größer ist, als die der peripheren T-Zellen. Möglicherweise sind in der Darmschleimhaut schon von Anfang an mehr T-Zellen für Th1 differenziert als in der Peripherie, so daß es schneller zu entsprechender Zytokinproduktion kommen kann. Unterstützung findet diese Annahme in Agace et al., 2000 [106]. Hier wird beschrieben, daß in der Lamina propria und in intraepithelialen Lymphozyten hauptsächlich mit Th1-Lymphozyten assoziierte Rezeptoren vorhanden sind, deren Liganden während intestinaler Entzündungsvorgänge verstärkt exprimiert werden, und somit mehr Th1-Lymphozyten zur Migration in die intestinale Mukosa bringen. Weiterhin fanden Prehn et al., 1999 [107] in den mononukleären Zellen der Lamina Propria eine noch nicht identifizierte Substanz, die periphere T-Zellen und T-Zellen der Lamina Propria bei Kontakt mit TNF- $\alpha$  zur verstärkten IFN- $\gamma$  Sekretion anregt. Von mononukleären Zellen im Blut wird dieser Faktor anscheinend nicht gebildet.

Von Bedeutung ist dies insofern, als daß die durch das GALT vermittelte Th1-Reaktion des Immunsystems für toxische Substanzen, Nahrungsmittelan-tigene und Pathogene möglicherweise stärker ausgeprägt und schneller ist, als durch Vermittlung aus der Peripherie. Für den Verlauf von Autoimmunkrankheiten, speziell für den des IDDM bei NOD-Mäusen, könnte das eine Rolle spielen.

## 15 Mechanismen der durch PbCl<sub>2</sub> vermittelten Effekte

Die Bedeutung der verschiedenen T-Helfer-Zelltypen für die Diabetogenese wird im Tierversuch mit NOD-Mäusen deutlich. Werden neugeborenen NOD-Mäusen autoreaktive Th1- oder Th2-Zellen mit  $\beta$ -zellspezifischem T-Zellrezeptor transplantiert, induziert der Th1-Transfer IDDM, der Th2 Transfer nur eine Insulitis ohne IDDM-Manifestation [109, 110]. Die Applikation von Th1-Zellen mit Splenozyten diabetischer NOD-Mäusen in Gesunde führt zu einem verfrühten Beginn der Krankheit, ein Transfer von Th2-Zellen supprimiert die Krankheitsentstehung [114]. Der Diabetes bei NOD-Mäusen geht mit einer Dominanz von Th1-Reaktionen und einem entsprechenden Zytokinmuster einher [26, 6].

Durch Modulation der Zytokinbalance in Richtung Th2 konnte die Manifestation des IDDM hinausgezögert [111, 110, 109, 105, 32], bzw. eine Insulitis verhindert werden [74]. Diese kann durch mikrobielle, chemische oder diätetische Agenzien hervorgerufen werden [131]. Durch Zytokingabe oder vektorin-

duzierte Erhöhung der Produktion eines Zytokins wird bei NOD-Mäusen die Manifestation des IDDM beeinflusst. Zum Beispiel bewirken TGF- $\beta$  und teilweise auch IL-10 eine Protektion vor Insulinitis und Diabetes, und IFN- $\gamma$  kann den Diabetesbeginn beschleunigen [132, 32].

Der Zusammenhang der Th1-gewichteten Immunreaktion bei NOD-Mäusen mit dem Auftreten des IDDM legt die Vermutung nahe, daß die durch PbCl<sub>2</sub> ausgelöste Verschiebung der Zytokinproduktion in Richtung Th1 zu einem früheren Krankheitsbeginn führt oder den Krankheitsverlauf verstärken kann. Andererseits muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Induktion der oralen Toleranz mittels OVA, die zu einer Modulation der Immunantwort in Richtung Th2 führt, protektiv wirkt und die Krankheitsmanifestation hinauszögert.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist, daß das durch PbCl<sub>2</sub>-Gabe in seiner Expression verstärkte Zytokin TNF- $\alpha$  nicht nur immunregulatorisch im Sinne einer Th1-Verstärkung wirkt, sondern auch über zytotoxische Wirkung auf die  $\beta$ -Zellen direkt an der Diabetogenese beteiligt sein kann [112, 113, 81, 82].

Bisher kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, welcher Teil des Darmimmunsystems für die Induktion und Regulation der oralen Toleranz verantwortlich ist. Daher kann auch über das Angriffsziel oral zugeführten PbCl<sub>2</sub> nur spekuliert werden.

PbCl<sub>2</sub> oral moduliert die Zytokinproduktion. Zytokine werden außer von T-Zellen u. a. auch von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet [9]. Diese Zellen sind ebenso Kandidaten für den Angriffsort des Schwermetalls wie die antigenpräsentierenden Zellen der Peyerschen Plaques, der Lamina Propria und die Enterozyten.

Dendritische Zellen der Payerschen Plaques können in die mesenterialen Lymphknoten auswandern und dort naive T-Zellen zur Differenzierung in die eine oder die andere Richtung anregen [115, 116, 117]. Dies ist ein möglicher Mechanismus für die Vermittlung der Bleieffekte in der Peripherie.

Bleitionen interagieren wahrscheinlich mit mehreren Zellkomponenten, z.B. mit der Proteinkinase C (PKC). Diese ist von Relevanz für die Immunregulation und Zytokinexpression.

Es hat sich herausgestellt, daß Blei in der Lage ist, einige Subtypen der PKC reversibel zu inhibieren. Dazu gehört auch PKC- $\gamma$  [120]. PKC ist an der Regulation der Zytokinexpression beteiligt. Ihre Hemmung führt z.B. zu einer reduzierten IL-10 Expression, die normalerweise durch bestimmte Antigene ausgelöst wird. [118]. Außerdem moduliert PKC die Fähigkeit des TGF- $\beta$ , das Zellwachstum zu beeinflussen [119].

Interessanterweise ist die Aktivität der PKC- $\gamma$  in C57BL/6 erhöht [121], in NOD-Mäusen hingegen erniedrigt [122]. Auch dies ist eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Anfälligkeit der beiden Mausstämme für toxische Substanzen.

Bisher ist die Ansicht weit verbreitet, daß thymische T-Zellen Anergie durch verminderte proliferative Reaktionsfähigkeit auf körpereigene Antigene zu einem Schutz vor Autoimmunität führt. In NOD-Mäusen führt jedoch thymische T-Zellen Anergie, gemessen an der stark erniedrigten Proliferationsrate, wahrscheinlich zum Zusammenbruch der Toleranz für körpereigene Antigene und prädisponiert somit zum Auftreten von Autoimmunkrankheiten [122]. Dies ist vermutlich ebenfalls eine durch reduzierte PKC-Aktivität hervorgerufene Erscheinung, die mit verminderter Tyrosinphosphorylation des p42mapk und de-

fizienter p21ras Aktivierung einhergeht. Werden die Zellen mit Phorbolestern behandelt, kann die proliferative Antwort der Zellen verstärkt werden [122]. Auch durch exogen zugeführtes IL-4 wird die Proliferationsfähigkeit wiederhergestellt. In vivo wirkt dies protektiv gegen IDDM [27].

Da eine TGF- $\beta$  bzw. teilweise auch eine IL-10 Erhöhung in NOD-Mäusen protektiv wirken, besteht die Möglichkeit, daß diese Zytokine ebenfalls zu einer Erholung der Thymozyten T-Zellen Proliferation führen. Dadurch, daß PbCl<sub>2</sub>-Exposition in diesen Mäusen zu einer weiteren Reduktion dieser Zytokine führt, bewirkt es auf diesem Weg möglicherweise eine verfrühte Krankheitsmanifestation oder einen schwereren Krankheitsverlauf. Das ist auch über die Reduktion der PKC-Aktivität denkbar, oder durch Eingreifen in die während der Zellproliferation stattfindenden Replikationsvorgänge an anderer Stelle.

Weiterhin ist Blei in der Lage, von Zink abhängige Enzyme zu inaktivieren [123]. Über eine Beeinträchtigung zinkabhängiger Transkriptionsfaktoren könnte es auf dieser Ebene in die Zytokinproduktion eingreifen.

Zusammenfassend betrachtet kann Blei vermutlich die Expression verschiedener Zytokine auf unterschiedliche Art verändern und hierdurch das Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 Zytokinen stören.

Je nach genetischer Prädisposition des betroffenen Individuums kann dies zu einer starken Beeinträchtigung des Immunsystems führen.

## Teil V

# LITERATUR

## Literatur

- [1] R.S. Schwartz, N.R. Rose (1986); Autoimmunity: Experimental and Clinical Aspects; Ann. NY. Acad. Sci. 475:1
- [2] M. Kubo, B. Cinader (1990); Polymorphism of age-related changes in Interleukin production: Differential changes of T-helper subpopulations synthesizing IL-2, IL-3 and IL- 4; Eur.J.Immunol. 20:1289
- [3] S. Nisitani, T. Tsubata, M. Murakami, T. Honjo (1995);Administration of interleukin-5 or -10 activates peritoneal B-1 cells and induces autoimmune hemolytic anemia in anti-erythrocyte autoantibody-transgenic mice; Eur. J. Immunol. 25:3047
- [4] L. Pelletier, H. Tournade, P. Druet (1990); Immunotoxicity of Metals and Immunotoxicology p. 121; Plenum, NY.
- [5] P. Pietsch, H.W. Voir, K. Degitz, E. Gleichmann (1989); Immunological alterations inducible by mercury compounds. II. HgCl<sub>2</sub> and gold sodium thiomalate enhance serum IgE and IgG concentrations in susceptible mouse strains; Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 90:47
- [6] I.L. Campbell, T.W.H. Kay, L. Oxbrow, L.C. Harrison (1991);Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice;J. Clin. Invest. 87:739
- [7] Gross, Schölmerich, Gerok (1996); Die Innere Medizin; Schattauer Classics;
- [8] H. Kolb (1995); Diabetes Typ 1: Immunologische Aspekte; Die gelben Hefte 35:38
- [9] A. Rabinovitch, J.S. Skyler (1998); Prevention of Type 1 Diabetes; Med. Clin. North Am. 82:739
- [10] F. Calcinaro, L. Hao, H.P. Chase, G. Klingensmith, K.J. Lafferty (1992); Detection of cell-mediated immunity in type 1 diabetes mellitus; J. Autoimmun. 5:137
- [11] J. Nerup T. Mandrup-Poulsen, J. Molvig 1987; The HLA-IDDM association: implications for etiology and pathogenesis of IDDM; Diabetes Metab. Rev. 3:779
- [12] Gemsa, Kalden, Resch (1991); Immunologie; Thieme, Stuttgart: p 503
- [13] D. Owerbach, K.H. Gabbay (1996); The search for IDDM susceptibility genes: the next generation; Diabetes 45:544
- [14] J.F. Bach (1994); Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease; Endocr. Rev. 15:516

- [15] E.B.Lampeter (1993); Discussion remark to Session 24: BMT in autoimmune diseases; *Exp. Haematol* 21:1155
- [16] E.F. Lampeter, M. Homberg, K. Quabeck, U.W. Schaefer, P. Wernet, J. Bertrams, H. Grosse-Wilde, F.A. Gries, H. Kolb (1993); Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation; *Lancet* 341:1243
- [17] B. Vialettes, D. Maraninchi, M.P. San Marco, F. Birg, A.M. Stoppa, C. Mattei-Zevaco, C. Thivolet, L. Hermitte, P. Vague, P. Mercier (1993); Autoimmune polyendocrine failure -Type 1 diabetes mellitus and hypothyroidism- after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with lymphoblastic leukaemia; *Diabetologia* 36:541
- [18] R.K. Sibley, D.E. Sutherland, F. Goetz, A.F. Michael (1985); Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases; *Lab Invest* 53:132
- [19] P.F. Bougneres, J.C. Carel, L. Castano, C. Boitard, J.P. Gardin, P. Landais, J. Hors, M.J. Mihatsch, M. Paillard, J.L. Chaussain (1988); Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with cyclosporine; *N. Engl. J. Med.* 318:663
- [20] Canadian-European Randomized Control Trial Group (1988); Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention: Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion; *Diabetes* 37:1574
- [21] G. Feutren, L. Papoz, R. Assan, B. Vialettes, G. Karsenty, P. Vexiau, H. Du Rostu, M. Rodier, J. Sirmay, A. Lallemand (1986); Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset: Results of a multicentre double-blind trial; *Lancet* 2:119
- [22] A. Bendelac C. Boitard, P. Bedossa, H. Bazin, J.F. Bach, C. Carnaud (1988); Adoptive T cell transfer of autoimmune nonobese diabetic mouse diabetes does not require recruitment of host B lymphocytes; *J Immunol.* 141:2625
- [23] P.W. Rohane A. Shimada, D.T. Kim, C.T. Edwards, B. Charlton, L.D. Shultz, C.G. Fathman (1995); Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice; *Diabetes* 44:550
- [24] H.J. Aanstoot E. Sigurdsson, M. Jaffe, Y. Shi, S. Christgau, D. Grobbee, G.J. Bruining, J.L. Molenaar, A. Hofman, S. Baekkeskov (1994); Value of antibodies to GAD65 combined with islet cell cytoplasmic antibodies for predicting IDDM in a childhood population; *Diabetologia* 37:917
- [25] J.I. Rotter, C.M. Vadheim, D.L. Rimoim (1990); Genetics of diabetes mellitus; Rifkin, Porte: *Diabetes Mellitus: Theory and Practice* ed 4, Amsterdam p378

- [26] A. Rabinovitch (1998); An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus; *Diabetes Metab. Rev.* 14:129
- [27] M.J. Rapoport, A. Jaramillo, D. Zipris, A.H. Lazarus, D.V. Serreze, Leiter, Cyopick, Danska, Delovitch (1993); Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in NOD mice; *J. Exp. Med.* 178: 87
- [28] M.W. Sadelain H.Y. Qin, J. Lauzon, B. Singh (1990); Prevention of type 1 diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy; *Diabetes* 39:583
- [29] E.H. Leiter D.V. Serreze, M. Prochazka (1990); The genetics and epidemiology of diabetes in NOD mice; *Immunol Today* 11:147
- [30] B. Hulgren, X. Huang, N. Dybdal, T.A. Stewart (1996); Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice; *Diabetes* 45:812
- [31] M. Kjerrulf, D. Grdic, M. Kopf, N. Lycke (1998); Induction of gut mucosal immune responses: importance of genetic background and Th1/Th2 cross regulation; *Scand. J. Immunol.* 47:401
- [32] A. Rabinovitch (1994); Immunoregulatory and cytokine imbalances in pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation?; *Diabetes* 43: 613
- [33] T. Marth, W. Strober, R.A. Seder, B.L. Kelsall (1997); Regulation of transforming growth factor-beta production by interleukin-12; *Eur. J. Immunol* 27:1213
- [34] M. Marinaro, P.N. Boyaka, F.D. Finkelman, H. Kiyono, R.J. Jackson, E. Jirillo, J.R. McGhee (1997); Oral but not parenteral interleukin 12 redirects T helper 2 type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses; *J. Exp. Med* 185:415
- [35] R.A. Seder, W.E. Paul (1994); Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells; *Annu. Rev. Immunol.* 2:635
- [36] H. Maedo, A. Shiraishi (1996); TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10 mediated pathways in tumor-bearing mice; *J. Immunol.* 156(1):73
- [37] C.A. Janeway, S. Carding, B. Jones, J. Murray, P. Portoles, R. Rasmussen, J. Rojo, K. Saizawa, J. West, K. Bottomly (1988); CD4+ T cells: Specificity and Function; *Immunol. Rev.* 101:39
- [38] D. Frasca, S. Pucci, C. Goso, P. Barattini, S. Barile, C. Pioli, G. Doria (1997); Regulation of cytokine production in aging: use of recombinant cytokine to upregulate mitogen-stimulated spleen cells; *Mech Ageing Dev* 93:157
- [39] K.E. Wirth, C. Gloxhuber (1994); *Toxikologie*; Georg Thieme Verlag Stuttgart S. 14

- [40] G.L. Diamond P.E. Goodrum, S.P. Felter, W.L. Ruoff (1998); Gastrointestinal absorption of metals; *Drug Chem Toxicol* 21:223
- [41] MSD Manual CD-Rom;
- [42] Y. Heo, P.J. Parsons, D.A. Lawrence (1996); Lead differentially modifies cytokine production in vitro and in vivo; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138:149
- [43] Y. Heo, W.T. Lee, D.A. Lawrence (1998); Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1- and Th2-lymphocytes; *Toxicol. Sci.* 43:172
- [44] G.L. Warner, D.A. Lawrence (1986); Stimulation of murine lymphocyte responses by cations; *Cell. Immunol.* 101:425
- [45] M.J. McCabe, D.A. Lawrence (1990); The heavy metal lead exhibits B-cell stimulatory activity by enhancing B-cell Ia expression and differentiation; *J. Immunol.* 145:671
- [46] G.L. Warner, D.A. Lawrence (1988); The effect of metals on IL-2 related lymphocyte proliferation; *Int. J. Immunopharmacol.* 10:629
- [47] D.A. Lawrence (1981); Heavy Metal Modulation of Lymphocyte Activities: In vitro effects of Heavy metals on primary humoral immune responses; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 57:439
- [48] I.B. Autenrieth, N. Bucheler, E. Bohn, G. Heinze, I. Horak (1997); Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation; *Gut* 41:793
- [49] R. Kuhn, D. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, W. Muller (1993); Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis; *Cell* 75:263
- [50] A.B. Kulkarni, C. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K.C. Flanders, A.B. Roberts, M.B. Sporn, J.M. Ward, S. Karlsson (1993); Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:770
- [51] F.W. Scott, H.E. Cloutier, R. Kleemann, U. Wörz- Pagenstert P. Rowsell, H.W. Modler, H. Kolb (1997); Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats: dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from Th1 to Th2 cells; *Diabetes* 46:589
- [52] J. Karjalainen, J.M. Martin, M. Knip, J. Ilonen, B.H. Robinson, E. Savilahti, H.K. Akerblom, H.M. Dosch (1992); A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus; *N. Engl. J. Med.* 327:302
- [53] H. Wells (1911); Studies on the chemistry of anaphylaxis III. Experiments with isolated proteins, especially those of hen's egg; *J. Infect. Dis.* 9:14
- [54] G. Kroemer, A.C. Martinez (1992); Mechanisms of self tolerance; *Immunol Today* 13:401

- [55] J.F.A.P. Miller, G. Moraham (1992); Peripheral T cell tolerance; *Annu. Rev. Immunol.* 10:51
- [56] C.C. Whitacre, I.E. Gienapp, C.G. Orosz, D. Bitar (1991); Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis III. Evidence for clonal anergy; *J. Immunol.* 147:2155
- [57] D. Melamed, A. Friedman (1993); Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin; *Eur. J. Immunol.* 23:935
- [58] D.R. Koh (1998); Oral tolerance : mechanisms and therapy of autoimmune diseases; *Ann. Acad. Med. Singapore* 27:47
- [59] H.L. Weiner, A. Friedman, A. Miller, S.J. Khoury, A. al-Sabbagh, L. Santos, M. Sayegh, R.B. Nussenblatt, D.E. Trentham, D.A. Hafler (1994); Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens; *Annu. Rev. Immunol* 12:809
- [60] Y. Chen, V.K. Kuchroo, J.-I. Inobe, D.A. Hafler, H.L. Weiner (1994); Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis; *Science* 265:1237
- [61] H.L. Weiner (1997); Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases; *Immunol. Today* 18:335
- [62] B.S. Lundin, M.R. Karlsson, L.A. Svensson, L.A. Hanson, U.I. Dahlgren, E. Telemo (1999); Active suppression in orally tolerized rats coincides with in situ transforming growth factor-beta expression in the draining lymph nodes; *Clin. Exp. Immunol.* 116:181
- [63] A. Miller, O. Lider, H.L. Weiner (1991); Antigen-driven bystander suppression following oral administration of antigens; *J. Exp. Med.* 174:791
- [64] R. McCarron, R. Fallis, D. McFarlin (1990); Alterations in T cell antigen specificity and class II restriction during the course of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis; *J. Neuroimmunol.* 29:73
- [65] P. Lehmann, T. Forsthuber, A. Miller, E. Sercarz (1992); Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen; *Nature* 358:155
- [66] A.H. Cross, V.K. Tuohy, C.S. Raine (1993); Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination; *Cell. Immunol.* 146:261
- [67] D.L. Kaufman, M. Clare-Salzler, J. Tian T. Forsthuber, G.S. Ting, P. Robinson, N.A. Atkinson, E.E. Sercarz, A.J. Tobin, P.V. Lehmann (1993); Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes; *Nature* 366:69
- [68] R. Tisch, X.-D. Yang, S.M. Singer R.S. Liblau, L. Fugger, H.O. McDevitt (1993); Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice; *Nature* 366:72

- [69] N. Kerlero de Rosbo, R. Milo, M.B. Lees, D. Burger, C.C. Bernard, A. Ben-Nun (1993); Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein; *J. Clin. Invest.* 92:2602
- [70] J. Zhang, S. Markovic-Plese, B. Lacet, J. Raus H.L. Weiner, D.A. Hafler (1993); Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis; *J. Exp. Med.* 179(3):973
- [71] H.L. Weiner, G.A. Mackin, M. Matsui, E.J. Orav, S.J. Khoury, D.M. Dawson, D.A. Hafler (1993); Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis; *Science* 259:1321
- [72] R.J.S. Salk (1983); A study of myelin basic protein as a therapeutic probe in patients with multiple sclerosis; *Multiple Sclerosis* ed. Hallpike, Adams, Toutellotte p 621
- [73] D.E. Trentham, R.A. Dynesius-Trentham, E.J.Orav, D. Combitchi, C. Lorenzo, K.L. Sewell, D.A. Hafler, H.L. Weiner (1993); Effects of oral administration of collagen on rheumatoid arthritis; *Science* 261:1727
- [74] W.W. Hancock, M. Polanski, J. Zhang, N. Blogg, H.L. Weiner (1995); Suppression of insulinitis in non-obese diabetic mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and-10 transforming growth factor-beta and prostaglandin E; *Am. J. Pathol.* 147:1193
- [75] P.A. Gonnella, Y. Chen, J. Inobe, Y. Komagata, M. Quartulli, H.L. Weiner (1998); In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue following oral antigen in TCR-transgenic mice; *J. Immunol.* 160:4708
- [76] A.M. de Faria, S.M. Ficker, E. Speziali, J.S. Menezes, B. Stransky, V. Silva Rodrigues, N.M. Vaz (1998); Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice; *Mech. Ageing Dev* 102:67
- [77] J.H. Kim, M. Ohsawa (1995); Oral tolerance to ovalbumin in mice as a model for detecting modulators of the immunologic tolerance to a specific antigen; *Biol. Pharm. Bull.* 18:854
- [78] A.H. Haremann M.F. Richard, C. Boitard (1999); Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic mice; *Clin. Exp. Immunol.* 116:225
- [79] A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen (1995); IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice; *J. Immunol.* 154:4874
- [80] K. Shibuya, D. Robinson, F. Zonin, S.B. Hartley, S.E. Macatonia, C. Somoz, C.A. Hunter, K.M. Murphy, A. O´Garra (1998); IL-1alpha and TNF-alpha are required for IL-12 induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not in C57Bl/6 mice; *J. Immunol.* 160:1708

- [81] T. Mandrup-Poulsen, K. Bendtzen, C.A. Dinarello, J. Nerup (1987); Human TNF-potentiates IL-1 mediated pancreatic beta-cell cytotoxicity; *J. Immunol.* 139:4077
- [82] E. Dahlen, K. Dawe, L. Ohlsson, G. Hedlund (1998); Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse; *J. Immunol.* 160:3585
- [83] A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen, R.V.Rajotte, R.F. Power (1997); TNF-alpha down-regulates type 1 cytokines and prolongs survival of syngeneic islet grafts in nonobese diabetic mice; *J. Immunol.* 159:6298
- [84] H. Kolb (1997); Benign versus destructive insulinitis; *Diabetes/Metab Rev.* 13:139
- [85] C.A. Piccirillo, Y. Chang, G.J. Prud'homme (1998); TGF-beta somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice; *J. Immunol.* 161:3950
- [86] H. Rothe, V. Burkart, A. Faust, H. Kolb (1996); Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non obese diabetic mice; *Diabetologia* 39:119
- [87] A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen, R.C. Bleackley, R.F. Power, R.V. Rajotte (1995); Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice. Analysis of cytokine mRNA expression in the graft; *Transplantation* 60:368
- [88] M.K. Moritani, K. Yoshimoto, S. Ii, M. Kondo, H. Iwahana, T. Yamaoka, T. Sano, N. Nakano, H. Kikutani, M. Itakura (1996); Prevention of adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice with IL-10-transduced islet-specific Th1 lymphocytes. A gene therapy model for autoimmune diabetes; *J. Clin. Invest.* 98:1851
- [89] R. Kleemann, F.W. Scott, U. Wozz-Pagenstert, W.M. Nimal Ratnayake, H. Kolb (1998); Impact of dietary fat on Th1/Th2 cytokine gene expression in the pancreas and gut of diabetes-prone BB rats; *J. Autoimmun.* 11:97
- [90] M.M.Shull, I. Ormsby, A.B.Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin (1992); Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease; *Nature* 359:693
- [91] D.J. Berg, M.W. Leach, R. Kuhn, K. Rajewsky, W. Muller, N.J. Davidson, D. Rennick (1995); Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses; *J. Exp. Med.* 182:99
- [92] P. Garside, A.M. Mowat (1997); Mechanisms of oral tolerance; *Crit. Rev. Immunol.* 17:119
- [93] W. Strober, B. Kelsall, I. Fuss, T. Marth, B. Ludviksson, R. Ehrhardt, M. Neurath (1997); Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation; *Immunol. Today* 18:61

- [94] Z. Zhang, J.G. Michael (1990); Orally inducible immune unresponsiveness is abrogated by IFN-gamma treatment; *J. Immunol.* 144:4163
- [95] S. Strobel, A.M. Mowat (1998); Immune responses to dietary antigens; *Immunol. Today* 19:17
- [96] V. Galliaerde, C. Desvignes, E. Peyron, D. Kaiserlian (1995); Oral tolerance to haptens: intestinal epithelial cells from 2,4-dinitrochlorobenzene-fed mice inhibit hpten-specific T cell activation in vitro; *Eur. J. Immunol.* 25:1385
- [97] T. MacDonald (1983); Immunosuppression caused by antigen feeding. II. Suppressor T cells mask Peyer's Patches B cell priming to orally administered antigen; *Eur. J. Immunol.* 13:138
- [98] J.A. Mattingly (1984); Immunological suppression after oral administration of antigen. III. Activation of suppressor-inducer cells in the Peyer's patches; *Cell. Immunol.* 86:46
- [99] H.M. Harper, L. Cochrane, N.A. Williams (1996); The role of small intestinal antigen-presenting cells in the induction of T-cell reactivity to soluble protein antigens: association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance; *Immunology* 89:449
- [100] A. Miller, O. Lider, H.L. Weiner (1991); Antigen-driven bystander suppression following oral administration of antigens; *J. Exp. Med.* 174:791
- [101] T.R. Mosmann, R.L. Coffman (1989); Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties; *Annu. Rev. Immunol.* 7:145
- [102] M.J. McCabe, D.A. Lawrence (1991); Lead, a major environmental pollutant, is immunomodulatory by its differential effects on CD4+ T cell subsets; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111:13
- [103] Y. Heo, W.T. Lee, D.A. Lawrence (1997); In vivo the environmental pollutants lead and mercury induce oligoclonal T cell responses skewed toward type-2 reactivities; *Cell. Immuno.* 79:185
- [104] J. Radons, V. Burkart, H. Kolb (1997); MHC class II-dependent abnormal reactivity toward bacterial superantigens in immune cells of NOD mice; *Diabetes* 46:379
- [105] B. Hartmann, K. Bellmann, I. Ghiea, R. Kleemann, H. Kolb (1997); Oral insulin for diabetes prevention in NOD mice: potentiation by enhancing Th2 cytokine expression in the gut through bacterial adjuvant; *Diabetologia* 40:902
- [106] W.W. Agace, A.I. Roberts, L. Wu, C. Greineder, E.C. Ebert, C.M. Parker (2000); Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation; *Eur. J. Immunol.* 30:819

- [107] J.L. Prehn, C.J. Landers, S.R. Targan (1999); A soluble factor produced by lamina propria mononuclear cells is required for TNF-alpha enhancement of IFN-gamma production by T cells; *J. Immunol.* 163:4277
- [108] K. Bellmann, H. Kolb, S. Rastegar, P. Jee, F.W. Scott (1998); Potential risk of oral insulin with adjuvant for the prevention of type 1 diabetes: a protocol effective in NOD mice may exacerbate disease in BB rats; *Diabetologia* 41:844
- [109] J.D. Katz, C. Benoist, D. Mathis (1995); T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes; *Science* 268:1185
- [110] D. Healey, P. Ozegbe, S. Arden, P. Chandler, J. Hutton, A. Cooke (1995); 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
- [111] H. Rothe, A. Faust, U. Schade, R. Kleemann, G. Bosse, T. Hibino, S. Martin, H. Kolb (1994); Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon-gamma, but not of interleukin-4; *Diabetologia* 37:1154
- [112] K.D. Kröncke, V. Kolb-Bachofen, B. Berschick, V. Burkart, H. Kolb (1991); Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:752
- [113] T. Mandrup-Poulsen (1996); The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM; *Diabetologia* 39:100
- [114] R. Maron, N.S. Melican, H.L. Weiner (1999); Regulatory Th2-type T cell lines against insulin and GAD peptides derived from orally- and nasally-treated NOD mice suppress diabetes; *J. Autoimmun.* 12:251
- [115] B.L. Kelsall, W. Strober (1996); Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine peyer's patch; *J. Exp. Med.* 183:237
- [116] J.L. Viney, A.M. Mowat, J.M. O'Malley, E. Williamson, N.A. Fanger (1998); Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance; *J. Immunol.* 160:5815
- [117] L.M. Liu, G.G. MacPherson (1993); Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo; *J. Exp. Med.* 177:1299
- [118] T. Krakauer (1996); Evidence for protein kinase C pathway in the response of human peripheral blood mononuclear cells to cholera toxin; *Cell. Immunol.* 172:224
- [119] J. Saltis, A. Bobik (1996); Regulation by protein kinase C of transforming growth factor-beta 1 action on the proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats; *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:573

- [120] K. Murakami, G. Feng, S.G. Chen (1993); Inhibition of brain protein kinase C subtypes by lead; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264:757
- [121] S. Matsuyama, U. Namgung, A. Routtenberg (1997); Long-term potentiation persistence greater in C57Bl/6 than DBA/2 mice: predicted on basis of protein kinase C levels and learning performance; *Brain. Res.* 763:127
- [122] M.J. Rapoport, A.H. Lazarus, A. Jaramillo, E. Speck, T.L. Delovitch (1993); Thymic T cell anergy in autoimmune nonobese diabetic mice is mediated by deficient T cell receptor regulation of the pathway of p21ras activation; *J. Exp. Med.* 177:122
- [123] M.J. Warren, J.B. Cooper, S.P. Wood, P.M. Shoolingin-Jordan (1998); Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase; *TIBS* 23:217
- [124] C. Goebel M. Kubicka-Muranyi, T. Tonn, J. Gonzales, E. Gleichmann (1995); Phagocytes render chemicals immunogenic: oxidation of gold (I) to the T cell-sensitising gold (III) metabolite generated by mononuclear phagocytes; *Arch. Toxicol.* 69:450
- [125] S. Alonso A. Minty, Y. Bourlet, M. Buckingham (1986); Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates; *J. Mol. Evol.* 23:11
- [126] P.W. Gray, D.V. Goeddel (1983); Cloning and expression of murine immune interferon cDNA; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5842
- [127] E. Murphy S. Hieny, A. Sher, A.O'Garra (1993); Detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice; *J. Immunol. Methods* 162:211
- [128] C. Guron C. Sudarshan, R. Raghov (1995); Molecular organization of the gene encoding murine transforming growth factor beta 1; *Gene* 165:325
- [129] Y. Tone S.A. Thompson, J.M. Babik, K.F. Nolan, M. Tone, C. Raven, H. Waldmann (1996); Structure and chromosomal location of the mouse interleukin 12 p35 and p40 subunit genes; *Eur. J. Immunol.* 26:1222
- [130] T. Shirai N. Shimizu, S. Shiojiri, S. Horiguchi, H. Ito (1988); Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for mouse tumor necrosis factor; *DNA* 7:193
- [131] B. Singh, A. Rabinovitch (1993); Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes; *Autoimmunity* 15:209
- [132] N. Shehadeh, F. LaRosa, K.J. Lafferty (1993); Altered cytokine activity in adjuvant inhibition of autoimmune diabetes; *J. Autoimmunity* 5:291
- [133] B. Pilstrom, L. Bjork, J. Bohme (1995); Demonstration of a TH1 cytokine profile in the late phase of NOD insulinitis; *Cytokine* 7:806

- [134] A. Muir, A. Peck, M. Clare-Salzler, Y-H. Song, J. Cornelius, R. Luchetta, J. Krischer, N. Maclaren (1995); Insulin immunisation of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraislet interferon gamma transcription; *J. Clin. Invest.* 95:628
- [135] A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon, O. Sorensen, R.C. Bleackley (1996); Inducible nitric oxide synthase in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: Identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines in the islets; *Endocrinology* 137:2093
- [136] X.X. Zheng, A.W. Steele, W.W. Hancock, A.C. Sievens, P.W. Nickerson, P. Roy-Chaudhury, Y. Tian, T.B. Strom (1997); A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity and promotes suppressor phenomena in NOD mice; *J. Immunol.* 158:4507
- [137] N. Sarvetnick, D. Liggitt, S.L. Pitts, S.E. Hansen, T.A. Steward (1988); Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and Interferon-gamma; *Cell* 52:773
- [138] N. Sarvetnick, J. Shizuru, D. Liggitt, L. Martin, B. McIntyre, A. Gregory, T. Parslow, T. Stewart (1990); Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma; *Nature* 346:844
- [139] S.M. Wahl, J.B. Allen, K. Ohura, D.E. Chenoweth, A.R. Hand (1991); Interferon gamma inhibits inflammatory cell recruitment and the evolution of bacterial cell-wall-induced arthritis; *J. Immunol.* 146:95
- [140] F. Novelli, F. Di Pierro, P.F. di Celle, S. Bertini, P. Affaticati, G. Garotta, G. Forni (1994); Environmental signals influencing expression of the IFN-gamma receptor on human T cells control whether IFN-gamma promotes proliferation or apoptosis; *J. Immunol.* 152:496
- [141] S. Trembleau, G. Penna, E. Bosi, A. Morbara, M.K. Gately, L. Adorini (1995); Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice; *J. Exp. Med.* 181:817
- [142] R.M. O'Hara, S.L. Henderson, A.M. Xagelin (1996); Prevention of Th1 disease by a Th1 Cytokine: IL-12 and diabetes in NOD mice; *Ann. NY Acad. Sci.* 795:241
- [143] M.K. Gately, L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stan, L. Adorini, U. Guber, D.H. Presky (1998); The interleukin 12/ interleukin 12-receptor system, role in normal and pathologic immuneresponses *Annu. Rev. Immunol.* 16:495
- [144] A.K. Abbas, K.M. Murphy, A. Sher (1996); Functional diversity of helper lymphocytes; *Nature* 383:87
- [145] G. Trinchieri (1995); Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity; *Annu. Rev. Immunol.* 13:251

- [146] R.A. Seder, R. Gazzinelli, A. Sher, W.E. Paul (1993); Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10188
- [147] P. Scott (1993); IL-12 Initiation cytokine for cell-mediated immunity; Science 260:496
- [148] R. Manetti, P. Parronchi, M. Giudizi, M. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, S. Romagnani (1993); Natural killer cell stimulator factor interleukin-12 induces T helper type 1 specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells; J. Exp. Med. 177:199
- [149] J. Magram, S. Connaughton, R. Warrier, D. Carvajal, C. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D. Faherty, M. Gately (1996); IL-12 deficient mice are defective in IFN-gamma production and type1 cytokine responses; Immunity 4:471
- [150] I.M. Rea, S.E. McNerlan, H.D. Alexander (2000); Total serum IL-12 and IL-12p40, but not IL-12p70 are increased in the serum of older subjects; Relationship to CD3+ and NK subsets; Cytokine 12:156
- [151] M. Kobayashi, L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clarke, S. Chan, R. Loudon, P. Sherman, R. Perussia, G. Trinchieri (1989); Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor, a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes; J. Exp. Med. 170:827
- [152] S.F. Wolf, P.A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, M. Hewick, K. Kelleher, S.H. Hermann, S.C. Clark, L. Assoni, S.H. Chan, G. Chan, G. Trinchieri, B. Perussia (1991); Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells; J. Immunol. 146:3074
- [153] M. Bette, S.C. Jin, T. Germann, M.K-H. Schafer, E. Weihe, E. Rude, B. Fleischer (1994); Differential expression of mRNA encoding Interleukin 12 p35 and p40 subunits in situ; Eur. J. Immunol. 24:2435
- [154] I.M. Rea, M. Stewart, P. Campbell, H.D. Alexander, T.C.M. Morris (1996); Changes in lymphocyte subsets, interleukin 2 and soluble interleukin 2 receptor in old and very old age; Gerontol. 42:69
- [155] R.A. Daynes, B.A. Araneo, W.B. Ershler, C.D. Maloney, G.Z. Li, S.Y. Ryu (1993); A dysregulation in the production of interleukin 6 with normal aging. Probable linkage to age-associated depression in dehydroepiandrosterone and its sulphated derivative; J. Immunol. 150:5219
- [156] L. O'Mahoney, J. Holland, J. Jackson, C. Fieghery, T.P.J. Hennessy, K. Mealy (1998); Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related change in pro-inflammatory cytokine production; Clin. Exp. Immunol. 113:213

- [157] I.M. Rea, S.E. McNerlan, H.D. Alexander, T.C.M. Morris (1997); Serum tumor necrosis factor and soluble interleukin 2 receptor are increased in elderly subjects; *Immunol. Lett.* 56:285
- [158] C. Pioll, S. Pucci, S. Barile, D. Frasca, G. Doria (1998); Role of mRNA stability in the different patterns of cytokine production by CD4+ cells from young and old mice; *Immunology* 94:380
- [159] D.S. Riminton, H. Korner, D.H. Strickland, F.A. Lemckert, J.D. Pollard, J.D. Sedgwick (1998); Challenging cytokine redundancy: Inflammatory cell movement and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin-deficient but not tumor necrosis factor-deficient mice; *J. Exp. Med.* 187:1517
- [160] J. Mysliwska, K. Zorena, A. Bakowska, A. Skuratowicz-Kubica, A. Mysliwski (1998); Significance of tumor necrosis factor alpha in patients with long-standing type-1 diabetes mellitus; *Horm. Metab. Res.* 30:158
- [161] R.E. Hunger, C. Carnaud, I. Garcia, P. Vassalli, C. Mueller (1997); Prevention of autoimmune diabetes mellitus in NOD mice by transgenic expression of soluble tumor necrosis factor receptor p 55; *Eur. J. Immunol.* 27:255
- [162] P.S. Ohashi, S. Oehen, P. Aichele, H. Pircher, B. Odermatt, P. Herrera, Y. Higuchi, K. Buerki, H. Hengartner, R.M. Zingernagel (1993); Induction of diabetes is influenced by the infectious virus and local expression of MHC class I and tumor necrosis factor- $\alpha$ ; *J. Immunol.* 27:5185
- [163] X-D. Yang, R. Tisch, S.M. Singer, Z. A. Cao, R.S. Liblau, R. D. Schreiber, H. O. McDevitt (1994); Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process; *J. Exp. Med.* 180:995
- [164] E.A. Green, E.E. Eynon, R.A. Flavell (1998); Local expression of TNF- $\alpha$  in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens; *Immunity* 9:733
- [165] C.O. Jacob, S. Aiso, S.A. Michie, H.O. McDevitt, H. Acha-Orbea (1990); Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor: similarities between TNF- $\alpha$  and interleukin-1; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:968
- [166] J. Satoh, H. Seinok, S. Shintani, S.I. Tanaka, T. Ohteki, T. Masuda, T. Nobunaga, T. Oteki, K. Kumagai, T. Toyota (1990); Inhibition of type I diabetes in BB rats with recombinant human tumor necrosis factor alpha; *J. Immunol.* 145:1395
- [167] I.S. Grewal, K.D. Grewal, F.S. Wong, D.E. Picarella, C.A. Janeway, R.A. Flavell (1996); Local expression of transgene encoded TNF- $\alpha$  in islets prevents autoimmune diabetes in NOD mice by preventing the development of autoreactive islet specific T cells; *J. Exp. Med.* 184:1963

- [168] Y.H.P. Higuchi, P. Muniesa, J. Harte, D. Belin, P. Ohashi, P. Aichele, L. Orci, J-D. Vassalli, P. Vassalli (1992); Expression of tumor necrosis factor alpha transgene in murine pancreatic beta cells result in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes; *J. Exp. Med.* 176:1719
- [169] M. Falcone, N. Sarvetnick (1999); The effect of local production of cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus; *Clin. Immunol.* 90:2
- [170] R. Mueller, T. Krahl, N. Sarvetnick (1998); Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice; *J. Exp. Med.* 184:1093
- [171] C. King, J. Davies, R. Mueller, M.S. Lee, T. Krahl, B. Yeung, E. O'Connor, N. Sarvetnick (1998); TGF-beta 1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype; *Immunity* 8:601
- [172] B. Seddon, D. Mason (1999); Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4+ CD45 RC-cells and CD4+CD8- thymocytes; *J. Exp. Med.* 189:279
- [173] K.J. Pennline, E. Roque-Gaffney, M. Monahan (1994); Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse; *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71:169
- [174] L. Wogensen, M.S. Lee, N. Sarvetnick (1994); Production of interleukin-10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice; *J. Exp. Med.* 179:379
- [175] M. Moritani, K. Yoshimoto, F. Tashiro, C. Hashimoto, J. Miyazaki, S. Ii, E. Kudo, H. Iwahana, Y. Hayashi, T. Sano, M. Itakura (1994); Transgenic expression of IL-10 in pancreatic islet A cells accelerates autoimmune insulinitis and diabetes in non-obese diabetic mice; *Int. Immunol.* 6:1927
- [176] F.W. Fitch, M.D. McKisic, D.W. Lancki, T.F. Gajewski (1993); Differential regulation of murine T lymphocyte subsets; *Annu. Rev. Immunol.* 11:29
- [177] K.V. Moore, A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, T.R. Mosmann (1993); Interleukin 10; *Annu. Rev. Immunol.* 11:165
- [178] N.F. Go, B.E. Castle, R. Barrett, R. Kastelein, W. Dang, T.R. Mosmann, K.W. Moore, M. Howard (1990); Interleukin 10 a novel B cell stimulatorz factor: unresponsiveness of X chromosome linked immunodeficiency B cells; *J. Exp. Med.* 172:1625
- [179] F. Rousset, E. Garcia, T. Defrance, C. Peronne, N. Vezzio, D.H. Hsu, R. Kastelein, K.W. Moore, J. Banchereau (1992); Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1890
- [180] I.A. MacNeil, T. Suda, K.W. Moore, T.R. Mosmann, A. Zlotnik (1990); IL 10 a novel growth cofactor for mature and immature T cells; *J. Immunol.* 145:4167

- [181] L. Thompson-Snipes, V. Dhar, M.W. Bond, T.R. Mosmann, K.W. Moore, D.M. Rennick (1991); Interleukin 10 a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors; *J. Exp. Med.* 173:507
- [182] F.W. Scott (1994); Food, diabetes and immunology; *Diet, Nutrition and Immunity*, CRC Press p 73
- [183] F.W. Scott (1996); Food-induced autoimmune diabetes; *Diabetes. Metab. Rev.* 12:341
- [184] F.W. Scott, G. Sarwar, H.E. Cloutier (1988); Diabetogenicity of various protein sources in the diet of the BB rat; *Adv. Exp. Biol. Med.* 246:277
- [185] J. Hoorfar, F.W. Scott, H.E. Loutier (1991); Dietary plant materioas and development of diabetes in the DP-BB rat; *J. Nutr.* 121:908
- [186] H. Kolb, P. Pozzilli (1999); Cow's milk and type 1 diabetes: the gut immune system deserves attention; *Trends* 20:108
- [187] H.L. Weiner, P.A. Gonnella, A. Slavin, R. Maron (1998); Oral tolerance: cytokine milieu in the gut and modulation of tolerance by cytokines; *Forum in Immunology*: 528
- [188] T. Xu-Amano, W.K. Aicher, T. Taguchi, H. Kiyono, J. McGhee (1992); Selective induction of Th2 cells in murine peyer's patches by oral tolerization; *Int. Immunol.* 4:433
- [189] D. Melamed, A. Friedman (1994); In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: Anergy in the absence of suppression; *Eur. J. Immunol.* 24:1974
- [190] A.M. Mowat, M. Steel, E.A. Worthy, P.J. Kewin, P. Garside (1996); Inactivation of Th1 and Th2 cells by feeding ovalbumin; *Ann. N.Z. Acad. Sci.* 778:122
- [191] S.J. Khoury, W.W. Hancock, H.L. Weiner (1992); Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4 and prostaglandin E expression in the brain; *J. Exp. Med.* 176:1355
- [192] G. Morahan, D. Huang, S.I. Ymer, M.R. Cancilla, K. Stephen, P. Dabadghao, G. Werther, B.D. Tait, L.C. Harrison, P.G. Colman (2001); Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL-12B allele; *Nat. Genet.* 27:218
- [193] A.A. Rossini, D.L. Greiner, H.P. Friedman et al. (1993); Immunopathogenesis of diabetes mellitus; *Diabetes Rev.* 1:43
- [194] J. Silverstein, N. MacLaren, W. Riley, R. Spillar, D. Radjenovic, S. Johnson (1988); Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus; *N. Engl. J. Med.* 319:599

- [195] T.R. Mosmann, H. Cherwinski, M.W. Bond M.A. Giedlin, R.L. Coffman (1986); Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins; *J. Immunol.* 136:2348
- [196] H.C. Cherwinski, J.H. Schumacher, K.D. Brown, T.R. Mosmann (1987) Two types of mouse helper T cell clone 3. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies; *J. Exp. Med.* 166:1229
- [197] G.F. Del Prete, M. De Carli, C. Mastomauro, R. Biagiotti, D. Macchia, P. Falagiani, M. Ricci, S. Romagnani (1991); Purified protein derivates of mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (Th1 or Th2) profiles of cytokine production; *J. Clin. Invest.* 88:346
- [198] Y. Chen, J-I. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V.K. Kuchroo, H.L. Weiner (1995); Peripheral deletion of antigen-reactive T-cells in oral tolerance; *Nature* 376:177
- [199] M.A. Atkinson, E.H. Leiter (1999); The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?; *Nat. Med.* 5:601
- [200] S. Makino, K. Kunimoto, Y. Muraoka, Y. Mizushima, K. Katagiri, Y. Tochino (1980); Breeding of a non-obese diabetic strain of mice; *Jikken Dobutsu* 29:1
- [201] H. Kikutani, S. Makino (1992); The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains; *Adv. Immunol.* 51:285
- [202] W.S. Gallichan, B. Balasa, J.D. Davies, N. Sarvetnick (1999); Pancreatic IL-4 expression results in islet-reactive Th2 cells that inhibit diabetogenic lymphocytes in the nonobese diabetic mouse; *J. Immunol.* 163:1696
- [203] W.F. Chen, A. Zlotnik (1991); IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor; *J. Immunol.* 147:528
- [204] H. Groux, M. Bigler, J.E. de Vries, M.G. Roncarolo (1998); Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells; *J. Immunol* 160:3188
- [205] J. Holda, T. Maier, H. Claman (1986); Natural suppressor activity in graft-vs-host spleen and normal bone marrow is augmented by IL-2 and IFN-gamma; *J. Immunol.* 137:353
- [206] J. Holda, T. Maier, H. Claman (1988); Evidence that IFN-gamma is responsible for natural suppressor activity in GVHD spleen and normal bone marrow; *Transplantation* 45:772
- [207] R. Huchet, M. Bruley-Rosset, C. Mathiot, D. Grandijon, O. Halle-Pannenko (1993); Involvement of IFN-gamma and TGF-beta in GVH reaction associated immunosuppression; *J. Immunol.* 150:2517

- [208] F. Mattner, S. Fischer, S. Guckes, S. Jin, H. Kaulen, E. Schmitt, E. Rude, T. Germann (1993); The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer; *Eur. J. Immunol.* 23:2202
- [209] S. Gillssen, D. Carvajal, P. Ling, F.J. Podlaski, D.L. Stremlo, P.C. Familletti, U. Gubler, D.H. Presky, A.S. Stern, M.K. Gately (1995); Mouse interleukin-12 p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist; *Eur. J. Immunol.* 25:200
- [210] H. Rothe, R.M. O'Hara, S. Martin, H. Kolb (1997); Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin-12 antagonist IL-12p40; *Diabetologia* 40:641
- [211] S. Trembleau, G. Penna, S. Gregori, M.K. Gately, L. Adorini (1997); Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes; *Eur. J. Immunol.* 27:2330
- [212] R.H. Schwartz (1990); A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy; *Science* 248:1349
- [213] R. Coutant, A. Zeidler, R. Rappaport, D. Schatz, S. Schwartz, P. Raskin, D. Rogers, B. Bode, S. Crockett, J. Marks, L. Deeb, S. Chalew, N. MacLaren (1998); Oral insulin therapy in newly diagnosed immune mediated diabetes. Preliminary analysis of a randomized double blind placebo controlled study; *Diabetes* 47(Suppl1):A97
- [214] H. Fukaura, S.C. Kent, M.J. Pietrusewicz, S.J. Khoury, H.L. Weiner, D.A. Hafler (1996); Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T-cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients; *J. Clin. Invest.* 98:70
- [215] M.L. Barnett, D. Combitchi, D.E. Trentham (1996); A pilot trial of oral type 2 collagen in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis; *Arthritis Rheum.* 39:623
- [216] M.L. Barnett, J.M. Kremer, E.W. St.Clair, D.O. Clegg, D. Furst, M. Weisman, M.J.F. Fletcher, S. Chasan-Taber, E. Finger, A. Morales, C.H. Le, D.E. Trentham (1998); Treatment of rheumatoid arthritis with oral type 2 collagen: Results of a multicenter double-blind, placebo-controlled trial; *Arthritis Rheum.* 41:290
- [217] A.M.C. Faria, H.L. Weiner (1999); Oral tolerance: Mechanisms and therapeutic applications; *Adv. Immunol.* 73:153
- [218] A. Friedman, H. Weiner (1994); Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:6688
- [219] Y. Chen, J. Inobe, H.L. Weiner (1997); Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model; *Cell. Immunol.* 178:62

- [220] J.A. Zhang, L. Davidson, G. Eisenbarth, H.L. Weiner (1991); Suppression of diabetes in NOD mice by oral administration of porcine insulin; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10252
- [221] T. Marth, W. Strober, B.L. Kelsall (1996); High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: Systemic neutralization of IL-12 augments TGF-beta secretion and T-cell apoptosis; *J. Immunol* 157:2348
- [222] A.J. Slavin, R. Maron, G. Garcia, P. Gonella, H.L. Weiner (1998); Oral administration of IL-4 and IL-10 enhance the induction of low dose oral tolerance; *FASEB J.* II:A599
- [223] H. Rothe, V. Burkart, A. Faust, H. Kolb (1996); Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice; *Diabetologia* 39:119
- [224] Y. Nitta, S. Kawamoto, F. Tashiro, H. Aibara, T. Yoshimoto, H. Nariuchi, K. Tabayashi, J. Miyazaki (2001); IL-12 plays a pathologic role at the inflammatory loci in the development of diabetes in NOD mice; *J. Autoimmun.* 16:97
- [225] P. Kalinski, P.L. Vieira, J.H. Schuetemaker, E.C. de Jong, M.L. Kapfenberg, (2001); Prostaglandin E2 is a selective inducer of interleukin 12p40 production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer; *Blood* 97:3466
- [226] K. Suk, S. Kim, Y.H. Kim, K.A. Kim, I. Chang, H. Yagita, M. Shong, M.S. Lee (2001); IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulator factor-1 pathway in pancreatic beta cell death; *J. Immunol.* 166:4481
- [227] K. Bellmann, H. Kolb, B. Hartmann, H. Rothe, P. Rowsell, S. Rastegar, K. Burghard, F.W. Scott (1997); Intervention in autoimmune diabetes by targeting the gut immune system; *Int. J. Immunopharmac.* 19:573
- [228] R.B. Elliott, J.M. Martin (1984); Dietary protein: a trigger of insulin dependent diabetes in the BB-rat?; *Diabetologia* 26:297
- [229] F.W. Scott, J.M. Norris, H. Kolb (1996); Milk and Type 1 diabetes; *Diabetes Care* 19:379
- [230] R.B. Elliott, N. Bibby, S. Reddy (1997); in: *Genetic and Environmental Risk Factors for Type 1 Diabetes* (eds.: Laron, Karp); p 57
- [231] K.E. Balashov, S.J. Khoury, D.A. Hafler, H.L. Weiner (1995); Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis; *Clin. Invest.* 95:2711
- [232] Y. Chen, J. Inobe, H.L. Weiner (1995); Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression; *J. Immunol* 155:910

- [233] H. Kolb (1987); Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozotocin-induced diabetes and nonobese diabetic mice; *Diabetes Metab. Rev* 3:751
- [234] J. Sieper, S. Kary, H. Sørensen, R. Alten, U. Eggens, W. Hüge (1996); Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial; *Arthritis Rheum.* 39:41
- [235] EHS. Choy, DL. Scott, GH. Kingsley, S. Thomas, AGV. Murphy, N. Staines, GS. Panayi (2001); Control of rheumatoid arthritis by oral tolerance; *Arthritis Rheum.* 44:1993

## Teil VI

# ANHANG

### 16 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Kolb sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für zahlreiche wertvolle Ratschläge, konstruktive Kritik und Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit.

Herrn Dr. C. Goebel und Frau Dr. K. Bellmann danke ich für die hervorragende fachliche Betreuung und experimentelle Hilfe.

Herrn Prof. Dr. vom Dahl gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kolb, Burkart und Martin, insbesondere Frau A. Schober, Frau J. Brüggemann und Frau W. Fingberg, danke ich für viele nützliche Tips, praktische Hilfe und eine ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

# 17 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name, Vorname	Kirchhoff, Katja
Geburtsdatum	15.05.1974
Geburtsort	Düsseldorf
Nationalität	deutsch

## Berufliche Tätigkeiten

Seit 01.09.02	Weiterbildungsassistentin für Augenheilkunde in der Praxis Dr.Klein/ Dr.Hugger, Augenklinik Tausendfensterhaus, Duisburg
15.02.01 bis 15.08.02	AiP am St. Martinus Krankenhaus Düsseldorf, Augenheilkunde

## Veröffentlichungen

„*The gut cytokine balance as a target of lead toxicity*“  
Goebel, K. Kirchhoff, H. Wasmuth, S. Flohé, R.B. Elliot,  
H. Kolb  
Life Sciences 1999, Vol. 64, No. 24; 2207  
„*Orally administered lead chloride induces bias of mucosal  
immunity*“  
C. Goebel, S. Flohé, K. Kirchhoff, C. Herder, H. Kolb  
Cytokine 2000, Vol 12, No. 9; 1414

## Hochschulausbildung

Oktober 1993	Aufnahme des Studienganges der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
September 1995	Ärztliche Vorprüfung
September 1996	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1999	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 1999- März 2000	Praktisches Jahr am Marien-Hospital Düsseldorf und am Victoria-Hospital der University of Cape Town
Mai 2000	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 2000-2001	Fortführung der Dissertation

## Schulbildung

1980 – 1984	Katholische Grundschule, Düsseldorf
1984 – 1993	Goethe-Gymnasium, Düsseldorf
Juni 1993	Abitur

## Zusammenfassung

Zum ersten Mal wurde die Zytokinexpression in Darmgewebe von NOD Mäusen, einem Tiermodell für Diabetes, anhand der Zytokin-mRNA untersucht, um Aufschluß über mit dem Alter auftretende, bzw. diabetesassoziierte Veränderungen zu erhalten. Als Vergleichsgruppe dienten C57BL/6 Mäuse. Die Expression der eher proinflammatorischen Th1-Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  war bei diabetischen NOD verstärkt, IL-12 p40 konnte erst im Darmgewebe frisch diabetischer NOD-Mäuse nachgewiesen werden. Die Expression der eher antiinflammatorischen Th2-Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 war bei diabetischen NOD-Mäusen geringer. Das Zytokinegleichgewicht war also bei diabetischen NOD-Mäusen signifikant in Richtung Th1 verschoben, bei C57BL/6 verschiedenen Alters waren diese Veränderungen nicht in diesem Ausmaß zu beobachten. Das Zytokinegleichgewicht war hier weitgehend ausgeglichen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß das Immunsystem der NOD-Maus mehr in Richtung einer Th1 Reaktion tendiert, als das der C57BL/6-Maus. Durch Modulation des Immunsystems der NOD-Maus in eine bestimmte Richtung kann der Verlauf des Typ 1 Diabetes möglicherweise beeinflusst werden.

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, in wie weit das Darmimmunsystem im Rahmen dieser Modulationen eine Rolle spielen könnte, wurden Experimente zur oralen Toleranz durchgeführt, sowie zur Beeinflussung der oralen Toleranz durch PbCl<sub>2</sub>

Die mRNA der Th-2 Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 wird in Darmgewebe von für OVA oral toleranten, 5 bis 6 Wochen alten, NOD- und C57BL/6-Mäusen vermehrt exprimiert und dadurch das Immungleichgewicht signifikant in Richtung Th-2 verschoben. Durch zusätzliche s.c. Applikation von PbCl<sub>2</sub> wird die Expression von IL-10 und TGF- $\beta$  bei für OVA oral toleranten NOD-Mäusen signifikant unterdrückt, bei C57BL/6 nur tendenziell. Dies stellt bei NOD eine Modulation des Zytokinegleichgewichtes in Richtung Th1 dar, die bei C57BL/6 in diesem Ausmaß nicht zu finden ist. Das Immunsystem von NOD-Mäusen ist anscheinend empfindlicher für die Umwelttoxine PbCl<sub>2</sub>

Dementsprechend war die Proliferationsrate von Milz-T-Lymphozyten von für OVA oral toleranten NOD-Mäusen als Antwort auf OVA Exposition hochsignifikant niedriger und die TGF- $\beta$  Sekretion hochsignifikant höher als von unbehandelten NOD. Bei Zellen von Tieren, die zusätzlich s.c. mit PbCl<sub>2</sub> behandelt worden waren, war die Proliferation der Milz-T-Lymphozyten signifikant höher, die TGF- $\beta$  Sekretion wiederum deutlich, wenn auch nicht signifikant niedriger als bei den nicht mit PbCl<sub>2</sub> behandelten.

Auf Antikörperebene zeigte sich nur eine tendenzielle Verschiebung des Immungleichgewichtes in Richtung Th2 durch Induktion oraler Toleranz, und in Richtung Th1 durch zusätzliche PbCl<sub>2</sub> Behandlung.

Eine orale PbCl<sub>2</sub> Behandlung von für OVA oral toleranten 9 Wochen alten NOD zeigte ähnliche Ergebnisse. Auch hier fand eine bezüglich IFN- $\gamma$  signifikante Verschiebung der Immunreaktion in Richtung Th1 durch PbCl<sub>2</sub> statt. Jedoch kam sie in diesem Fall eher durch eine hochsignifikant verstärkte Expression der IFN- $\gamma$ -mRNA zustande und durch einen Rückgang der TGF- $\beta$  Expression. IL-10 blieb durch die orale PbCl<sub>2</sub>-Behandlung unbeeinflusst, auch TNF- $\alpha$  zeigte keine signifikanten Veränderungen.

Die Ergebnisse des Proliferationsassays von Lymphozyten aus Lymphknoten dieser Mäuse entsprachen etwa denen der Milz-T-Lymphozyten der s.c. behandelten Mausgruppe. In den Zellüberständen dieser Lymphozyten sah man eine durch orale PbCl<sub>2</sub> Behandlung verminderte TGF- $\beta$ -Sekretion und leicht vermehrte IFN- $\gamma$  Sekretion. Auch hier wurde IL-10 nicht beeinflusst.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß PbCl<sub>2</sub> auch ohne vorherige Induktion einer oralen Toleranz die Zytokinproduktion in Darmgewebe der NOD-Maus eher in Richtung einer vermehrten Th1 Expression beeinflusst. Es scheint in diesem Fall jedoch auf die Produktion aller Zytokine einen negativen Einfluß auszuüben.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß PbCl<sub>2</sub> ein potenter Modulator des Darmimmunsystems auf Zytokinebene ist und daß NOD-Mäuse für die durch das Umwelttoxin ausgelösten Veränderungen in Richtung einer Th1-Reaktion empfindlicher sind als der Vergleichsstamm C57BL/6. Möglicherweise kann durch Bleichlorid also der Verlauf eines Diabetes Typ 1 beschleunigt werden und durch die Induktion einer oralen Toleranz, die das Immunsystem auf Zytokinebene in Richtung einer Th2 Reaktion drängt, positiv beeinflusst werden.