

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie  
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen  
Direktor: Prof. Dr. Erhard Seifried

**Die Rolle des  $\alpha$ 4-Integrins in der  
Pathophysiologie des Autoimmundiabetes am Modell der  
spontan diabetischen NOD Maus**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Salim Oulghazi

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Halvard Bönig
Korreferent/in:	Prof. Dr. Thomas Oellerich
2. Korreferent/in:	Prof. Dr. Ingrid Fleming
Tag der mündlichen Prüfung:	12.10.2021

*Meinen Eltern, Naima Tazzoute und Hammou Oulghazi*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	2
<b>1. Einleitung</b> .....	3
1.1. Humaner Typ 1 Diabetes – Epidemiologie, Genetik, Autoimmunität, Umwelteinflüsse .....	3
1.2. NOD Maus .....	10
1.3. Das $\alpha 4$ -Integrin – Molekularbiologie, Immunologie, pharmakologische und genetische Modelle .....	15
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit .....	21
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	22
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	22
2.1.2. Medien .....	23
2.1.4. Kits.....	24
2.1.5. Antikörper .....	24
2.1.6. Mäuse.....	25
2.2. Methoden .....	26
2.2.1. Tier-Experimente.....	26
2.2.1.1. Blutzucker-Messung.....	26
2.2.1.2. Blut- und Organentnahmen .....	26
2.2.1.3. Erythrozyten-Lyse.....	27
2.2.1.4. Präparation von Splenozyten und Knochenmark.....	27
2.2.1.5. Automatische Hämazytometrie .....	27
2.2.1.6. Plasmagewinnung .....	28
2.2.1.7. Knochenmark-Transplantation.....	28
2.2.1.8. Adoptiver T-Zell Transfer .....	28
2.2.1.9. Ex vivo Imaging nach adoptivem Transfer von transduzierten CD3+ Zellen .....	29
2.2.1.10. Präparation von Pankreas-infiltrierenden Lymphozyten .....	30
2.2.1.11. Prüfung der humoralen Immunkompetenz von NOD und NOD. $\alpha 4$ -/ Mäusen .....	31
2.2.1.12. Mikrobiota-Analysen .....	32
2.2.2. Durchflusszytometrie .....	32
2.2.2.1. Oberflächenanalyse.....	33
2.2.2.2. Intrazelluläre Färbung (IFN $\gamma$ ).....	34
2.2.2.3. Dextramer/Tetramerfärbung (MHCI/MHCII) .....	34
2.2.3. Biochemische Methoden.....	35
2.2.3.1. IAA-Sandwich-ELISA.....	35
2.2.3.2. HBs-ELISA .....	36
2.2.3.3. Zytokin-Assay.....	36
2.2.3.4. Immunomagnetische Zellanreicherung.....	36

2.2.4. Molekularbiologische Methoden .....	37
2.2.4.1. PCR .....	37
2.2.4.2. Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	39
2.2.4.3. Transformation von <i>E. coli</i> .....	40
2.2.4.4. Testrestriktion .....	41
2.2.4.5. DNA-Isolation .....	42
2.2.4.6. Kultivierung von HEK293T Zellen .....	42
2.2.4.7. Transfektion .....	42
2.2.4.8. Aufkonzentrierung der Viruspartikel .....	43
2.2.4.9. Transduktion .....	43
2.2.5. Datenanalyse und Software .....	44
<b>3. Ergebnisse</b> .....	44
3.1. Primärprävention .....	44
3.2. Sialitis-Histologie .....	45
3.3. Mikrobiom .....	47
3.4. Analyse des zellulären Immunsystems der NOD.α4 <sup>-/-</sup> Maus .....	49
3.4.1. T-Zell-Subtypen .....	49
3.4.2. Inselzell-reaktive zytotoxische T-Zellen .....	54
3.4.3. Inselzell-reaktive T-Helfer-Zellen .....	56
3.4.4.1. Adoptiver CD3 <sup>+</sup> T-Zell-Transfer .....	60
3.4.4.2. Ex vivo Luminographie nach adoptivem CD3 <sup>+</sup> T-Zell-Transfer .....	62
3.4.4.3. Adoptiver CD4 <sup>+</sup> T-Zell Transfer .....	65
3.5. Analysen der humoralen Achse des Immunsystems der NOD.α4 <sup>-/-</sup> Maus .....	67
3.5.1. B-Zell-Reifung .....	67
3.5.2. Impfantwort: Primär- und Sekundärimmunisierung .....	70
3.5.3. Insulin-Autoantikörper .....	71
3.6. Sekundärprävention .....	72
<b>4. Diskussion</b> .....	74
<b>5. Anhang</b> .....	91
Literaturverzeichnis .....	91
Danksagung .....	99
Schriftliche Erklärung .....	100

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte .....	22
Tabelle 2. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	22
Tabelle 3. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Medien .....	23
Tabelle 4. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits.....	24
Tabelle 5. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.....	24
Tabelle 6. Reaktionsansatz und PCR-Programm zur Genotypisierung .....	38
Tabelle 7. Eingesetzte Oligonukleotidpaare in der Genotypisierungs-PCR .....	38
Tabelle 8. Reaktionsansatz zum Testverdau .....	41
Tabelle 9. Ansatz der OPTI-MEM-Lösungen zur Transfektion .....	43

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Pathogenese des Typ 1 Diabetes nach Atkinson und Eisenbarth, 2001....	6
Abbildung 2 Einflüsse von nicht-HLA-assoziierten Loci in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes. Nach Concannon <i>et al.</i> , 2009.....	7
Abbildung 3 Intrazelluläre $\alpha 4$ -Integrin-vermittelte Signalwege und deren Regulation durch ILK (integrin-linked-kinase) nach Shishido <i>et al.</i> , 2014.....	18
Abbildung 4 Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Transplantationsregimes.....	28
Abbildung 5 Schema des in dieser Arbeit verwendeten adoptiven T-Zell-Transfers ...	29
Abbildung 6 Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Transduktionsregimes.....	30
Abbildung 7 Schematische Darstellung der Hepatitis-B Immunisierungsstudie .....	31
Abbildung 8 Repräsentatives Beispiel für die $\alpha 4$ -Expression auf PBMCs der wildtypischen NOD Maus.....	34
Abbildung 9 Konstruktion der loxP-flankierten $\alpha 4$ -Allele und Genotypisierungsstrategie. ....	37
Abbildung 10 $\alpha 4$ - und Cre-Genotypisierung.. .....	39
Abbildung 11 Plasmid-Karte des pSEW-lucs2-Vektors mit Darstellung der Schnittstellen für Restriktionsenzyme. ....	41
Abbildung 12 T1D-Primärprävention. ....	45
Abbildung 13. Sialitis-Histologie.....	46
Abbildung 14. Sialitis-Primärprävention. Infiltrationsscore.....	47
Abbildung 15 Mikrobiom-Analyse.....	48
Abbildung 16. Gating-Strategie für T-Zell-Subtypenanalyse.....	50
Abbildung 17. Frequenz von CD3+ T-Zellen unter den Leukozyten.. .....	51
Abbildung 18. Frequenz der NK-Zellen (CD335+) unter den Leukozyten.....	51
Abbildung 19 Relativer Anteil der T-Zell-Subtypen. ....	52
Abbildung 20 Detektion inselzellreaktiver zytotoxischer T-Zellen.. .....	55
Abbildung 21. Detektion Inselzell-reaktiver T-Helfer-Zellen .....	57
Abbildung 22 Induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion von T-Helfer-Zellen.....	58
Abbildung 23. Adoptiver CD3+ T-Zell-Transfer. ....	60
Abbildung 24 $\alpha 4$ -Expression von Peripherblut- und Pankreas-infiltrierenden Lymphozyten von NOD. $\alpha 4$ -/- Mäusen nach adoptivem CD3+ T-Zell-Transfer diabetischer Spender. ....	61
Abbildung 25. FACS-Analysen von Splenozyten vor und nach lentiviraler Transduktion mit dem pSEW-lucs2 Vektor und nach FACS-basierter Zellsortierung. ....	62
Abbildung 26. <i>Ex-vivo</i> Luminographie.....	64
Abbildung 27. Quantitative Analyse der Radiance nach <i>in vivo</i> Transfer Luciferase-genmarkierter T-Zellen diabetischer Spendertiere. ....	65
Abbildung 28 Adoptiver CD4+ T-Zell-Transfer .....	66
Abbildung 29. Gating-Strategie der B-Zell-Entwicklungsstadien.....	68
Abbildung 30 Relativer Anteil unreifer B-Zellen an B220+ Zellen .....	69
Abbildung 31. B-Zell-Reifung. Frequenz der verschiedenen Entwicklungsstufen an allen B220+ Zellen .....	70
Abbildung 32 Humorale Immunantwort gegenüber einem für Induktion einer B-Zell-Antwort optimierten Impfstoff .....	71
Abbildung 33. Insulin-Autoantikörper .....	72
Abbildung 34 Sekundärprävention durch Knochenmark-Transplantation. ....	74

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ANA	<i>Antinuclear antibody</i>
BLI	Biolumineszenz-Imaging
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNA	Desoxyriboneukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
GAD65/ GADA	Glutamat-Decarboxylase 65/ Glutamat-Decarboxylase Antikörper
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
Gy	Grey
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IA2A	<i>Islet Tyrosine Phosphatase 2 Antibody</i>
IAA	<i>Insulin Autoantibody</i>
ICA	<i>Anti-Islet Cell Antibody</i>
IDDM	<i>Insulin dependent diabetes mellitus</i>
IGRP	<i>Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein</i>
KO	Knockout
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
NOD.scid	<i>Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	4-Methoxyamphetamin
RBC	<i>Red blood cells</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institution</i>
RT	Raumtemperatur
T1D	Typ 1 Diabetes
TCR	<i>T cell receptor</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
WT	Wildtyp
ZnT8A	<i>Zinc Transporter 8 Antibody</i>



## Zusammenfassung

Die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus ist eine auf hämatopoetische Zellen beschränkt  $\alpha 4$ -inkompetente Maus auf dem NOD Hintergrund. Die Maus ist vollständig gegen Diabetes gefeit, entwickelt keine Insulitis und keine Sialitis. Analysen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität des Mikrobioms zeigen eine vergleichbare Zusammensetzung in NOD. $\alpha 4^{-/-}$  und NOD Kontrollmaus, während erkrankte Mäuse ein auffällig eingeschränktes Mikrobiom und atypische Spezies aufweisen. Inselzellantigen-spezifische CD8+ T-Zellen und anti-Insulin-Autoantikörper sind quantitativ stark vermindert im Vergleich zu NOD Kontrollen, jedoch sicher nachweisbar. Das 5-Linien-Differenzialblutbild ist absolut und relativ unauffällig. Die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus entwickelt nach adoptivem Transfer von CD3+ Zellen diabetischer NOD-Spender mit kurzer Latenz und 100%iger Penetranz Diabetes, ein isolierter Transfer diabetogener CD4+ Zellen ist hierzu nicht hinreichend.  $\alpha 4$ -kompetente CD8+ Zellen sind also unerlässlich für den adoptiven Transfer von Diabetes in die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus. Rekonstitution prädiabetischer wildtypischer NOD Empfänger mit NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Hämatopoese schützt diese zuverlässig vor dem Progress der Insulitis zum Diabetes. Diese Arbeit unterstreicht und sichert die bisherigen  $\alpha 4$ -Antikörper Studien in der NOD Maus und korrigiert die Annahme,  $\alpha 4$ -Blockade schütze nicht vor dem Voranschreiten der Sialitis. NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Lymphozyten werden regelrecht gegen Autoantigene sensibilisiert, in Ermangelung effektiver Infiltration der Zielorgane bleibt jedoch die Expansion antigenspezifischer T-zellen und das Boosten von humoralen Autoimmunantworten aus.  $\alpha 4$ -inkompetente Leukozyten migrieren auch nach Beginn einer Insulitis oder damit einhergehender Hochregulierung verschiedenster endothelialer Oberflächenproteine nicht in die entzündeten Langerhans-Inseln. Die sichere Prävention der Erkrankung durch Rekonstitution mit  $\alpha 4^{-/-}$  Hämatopoese identifiziert die  $\alpha 4$ -Blockade als mögliche Therapie des Typ 1 Diabetes während der Phase des Prädiabetes.

## Summary

The incidence of autoimmune (Type 1) diabetes (T1D) is increasing, meanwhile the age of onset decreasing. Treatment is with insulin replacement although islet preservation would be preferable. The spontaneously diabetic NOD mouse is a faithful model of human T1D and thus suitable for development of such therapies. Given the pivotal role of  $\alpha 4$  integrin (CD49d) in other autoimmune diseases, we generated NOD mice with  $\alpha 4$ -deficient hematopoiesis (NOD. $\alpha 4$ -/-) to assess their risk of diabetes development, and to study mechanistic questions such as adaptive immunity of NOD. $\alpha 4$ -/- mice against islet antigens and adoptive transfer of isolated diabetic T-cell populations into  $\alpha 4$ -deficient NOD mice. Moreover, NOD. $\alpha 4$ -/- mice offered the unique opportunity to compare the microbiota of co-housed unperturbed pre-diabetic and diabetic NOD and diabetes-resistant NOD. $\alpha 4$ -/- animals. NOD. $\alpha 4$ -/- mice had islet-specific T-cells and antibodies, albeit quantitatively less than their  $\alpha 4$ + counterparts. Nevertheless, NOD. $\alpha 4$ -/- mice were completely and life-long protected from diabetes and insulinitis. Transfer of  $\alpha 4$ + / CD3+ but not  $\alpha 4$ + / CD4+ splenocytes from diabetic to NOD. $\alpha 4$ -/- mice induced diabetes with short latency. Despite a modest contribution of adoptively transferred  $\alpha 4$ + / CD3+ cells to peripheral blood, pancreas-infiltrating T-cells were exclusively graft derived, i.e.  $\alpha 4$ +. Microbiota of diabetes-resistant NOD. $\alpha 4$ -/- and pre-diabetic NOD. $\alpha 4$ + mice were identical. The co-housed diabetic NOD. $\alpha 4$ + mice showed the characteristic diabetic dysbiosis, implying causality of diabetes for dysbiosis. Transplantation with isogenic  $\alpha 4$ -/- bone marrow prevented progression of pre-diabetic NOD. $\alpha 4$ + to T1D. Incidentally, NOD. $\alpha 4$ -/- mice were protected from autoimmune sialitis. The data propose  $\alpha 4$  integrin as a target for diabetes prevention.

# 1. Einleitung

## 1.1. Humaner Typ 1 Diabetes – Epidemiologie, Genetik, Autoimmunität, Umwelteinflüsse

Typ 1 Diabetes (T1D) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch den Verlust von insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen infolge autoreaktiver zytotoxischer T-Zellen gekennzeichnet ist. Die Erkrankung beginnt meist im Kindes- oder jüngeren Erwachsenenalter und geht anfangs zumeist mit einer Trias von Symptomen einher: Polydipsie, Polyphagie und Polyurie. Diese durch eine Hyperglykämie ausgelösten Symptome des Hypoinsulinismus werden derzeit durch eine lebenslange Insulinsubstitution, meist mit rekombinantem Insulin, behandelt. Die Dosen müssen hierbei stets auf den aktuellen Blutzuckerwert, die geplante Mahlzeit und Bewegungsumfang abgestimmt werden und bergen regelhaft die Gefahr einer Hypoglykämie und der damit verbundenen Komplikationen, einer akuten, krisenhaften Hyperglykämie bis zum Coma diabeticum, als auch der langfristigen vaskulären Schäden eines im Mittel chronisch erhöhten Blutglukosespiegels bei (chronischer) Untersubstitution.

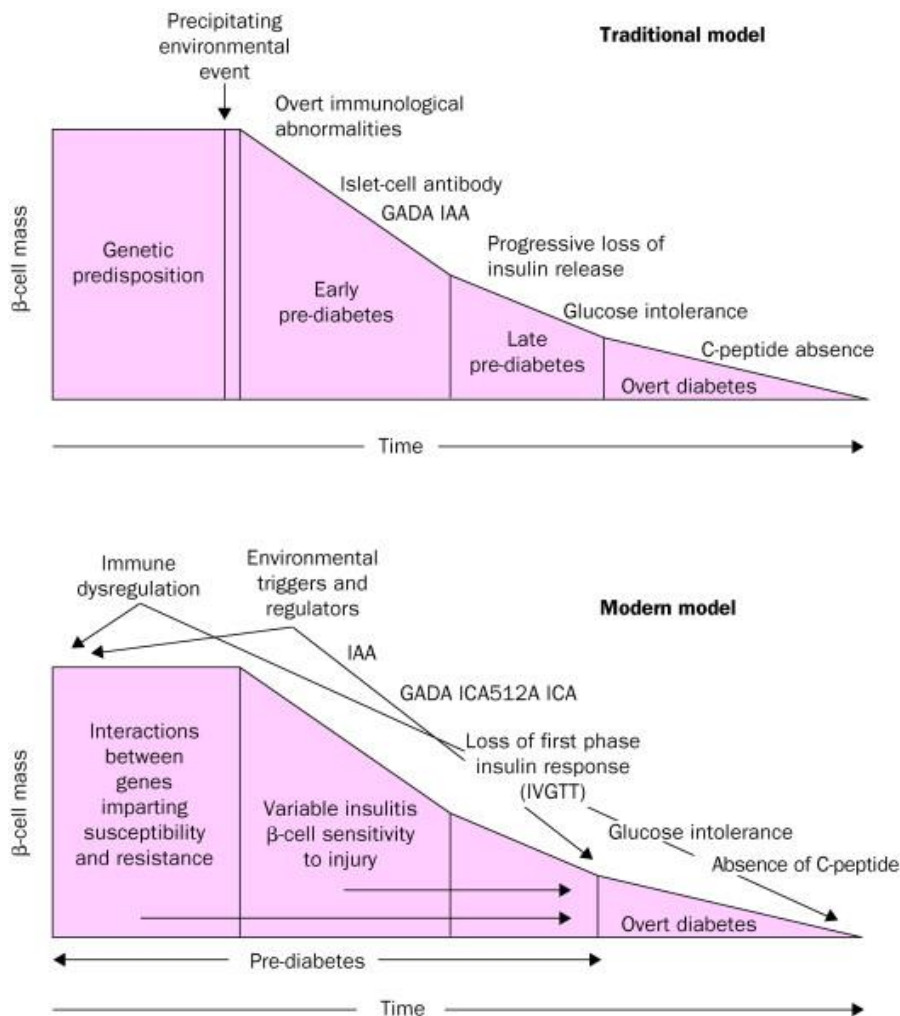
Als eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter zeigt T1D eine zweigipflige Inzidenzkurve, die im Alter zwischen fünf bis sieben Jahren den ersten und während der Pubertät ihren zweiten Gipfel erreicht.<sup>1</sup> Während die meisten Autoimmunerkrankungen Frauen häufiger betreffen, ist dies beim Typ 1 Diabetes nicht der Fall. Ätiologisch möglicherweise informativ, zeigt sich eine saisonale Häufung bezüglich des Erkrankungsbeginns. So erkranken mehr Menschen in den Herbst- und Wintermonaten an Typ 1 Diabetes als im Frühling und Sommer.<sup>2</sup> Neue Studien, die die Entwicklung der T1D-assoziierten Autoimmunität noch vor Erkrankungsbeginn untersuchen sollten, konnten interessanterweise zeigen, dass die angesprochenen Jahreszeiten mit einer Synchronisierung der Antikörper-Titer einhergehen.<sup>3</sup> Möglicherweise bedeutet das, dass im Frühjahr prävalente Antigene, etwa saisonale Viren oder Pflanzenteile, die mit Inselzellantigenen kreuzreagieren, diese Antikörper boostern und vielleicht sogar kausal an der Entstehung des Diabetes beteiligt sind. Erste multizentrische Zahlen zur Verteilung der Prävalenzen in Europa, den USA und weltweit lieferten die Arbeitsgruppen EURODIAB, SEARCH for

Diabetes in Youth<sup>4</sup> und DIAMOND<sup>5</sup>. Außerdem konnte hierdurch auch gezeigt werden, welche Rolle die Ethnien bezüglich des Erkrankungsrisikos haben. Hier ist deutlich zu sehen, dass unter den weniger als zehn Jahre Alten die „non-Hispanic whites“ die höchste Prävalenzrate von 24,8/100000 pro Jahr haben, gefolgt von „African-Americans“ bei etwa 16/100000 pro Jahr. Von Interesse ist zudem der unabhängig von Ethnien oder Geschlecht auftretende Anstieg der Prävalenzen von 21,1% im Zeitraum von 2001-2009. Diese Anstiege pro Jahr belaufen sich in Schweden und Norwegen auf etwa 3,3% und in Finnland auf etwa 2,4%. Bei einer Fortsetzung eines solchen Anstiegs würden die Inzidenzen sich im kommenden Jahrzehnt nahezu verdoppeln und eine weitere erhebliche Belastung der Gesundheitssysteme bedeuten.

Global betrachtet lassen sich auch interessante Kenntnisse für die offensichtliche Rolle von umweltbedingten Einflüssen beim Typ 1 Diabetes zeigen. So zeigt sich bei den ländereigenen Angaben zu Inzidenzen und Prävalenzen des T1D eine 350-fache Varianz.<sup>6,7</sup> Wie auch bei der Multiplen Sklerose, einer Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, lässt sich im Falle von T1D ein Nord-Süd-Gefälle beobachten, mit einem deutlich erhöhten Risiko nördlich des Äquators.<sup>5</sup> Länder, die die niedrigsten T1D-Erkrankungsraten haben sind China, Indien und Venezuela mit etwa 0,1 Fällen pro 100000 Individuen. Dem gegenüber stehen Länder wie Schweden, Norwegen, Portugal, Großbritannien oder Kanada mit einer Prävalenzrate die jeweils höher als 20/100000 ist.<sup>8</sup> Führend sind jedoch Finnland und Sardinien mit mehr als 60 beziehungsweise 40 Fällen pro 100000 Individuen. Interessanterweise sind die direkten Nachbarn dieser Länder deutlich weniger betroffen. Dies ist vor allem am Beispiel von Finnland und Estland zu verdeutlichen. Diese zwei Länder liegen nur etwa 80 Kilometer voneinander entfernt und sind ethnisch nah verwandt, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Prävalenz um etwa das Dreifache. Diese Beobachtungen können zum jetzigen Zeitpunkt nicht wirklich erklärt werden, deuten aber gleichermaßen auf einen exogenen Trigger hin, der diese Erkrankung innerhalb strenger geographischer Grenzen antreibt.<sup>8</sup>

In den letzten drei Jahrzehnten wurde unser Wissen rund um die Pathogenese des T1D dramatisch verbessert, sodass selbst älteste Dogmen nun wieder in der Diskussion stehen. Die Entwicklung von Methoden zur Untersuchung von

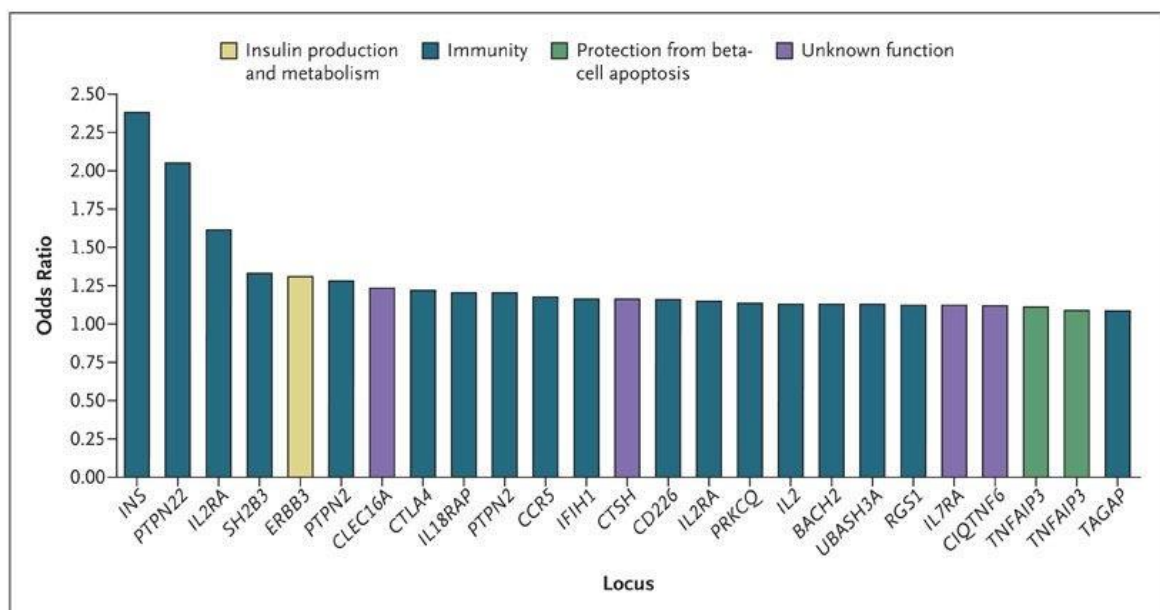
Genen, Autoantikörpern oder auch metabolischen Markern, wie beispielsweise dem C-Peptid, führten zur Etablierung erster Modelle der Erkrankung. Besonders hervorzuheben ist das Modell nach G. S. Eisenbarth aus dem Jahre 1986 (s. Abbildung 1). Dieses beschreibt den Typ 1 Diabetes als eine Erkrankung von Individuen mit einer genetischen Prädisposition und einer determinierten Anzahl an funktionsfähigen insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen, die ausgelöst durch einen exogenen Trigger (Viren, Bakterien, Diät, Vitamin D) die Produktion von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Zellen anregen und über diese schließlich zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und Verlust der sekretorischen Fähigkeit dieser Zellen führt.<sup>9</sup> Gemäß diesem Modell muss ein Verlust von 80-90% der  $\beta$ -Zellen vorliegen, um eine Hyperglykämie auszulösen. Zusätzlich ist zu betonen, dass nach Autosensibilisierung und Beginn der Insulinitis zum Teil mehrere Jahre vergehen können, bevor ein manifester Diabetes auftritt. Auch wenn dieses Modell mit Sicherheit als Orientierung und Erklärungsansatz hilfreich war und ist, gibt es einige neuere Erkenntnisse, die das Modell infrage stellen. Erstens wurde beobachtet, dass Patienten trotz früher T1D Diagnose Jahrzehnte später noch immer residuale insulinproduzierende  $\beta$ -Zellen aufweisen, sprich die  $\beta$ -Zellen werden nie in ihrer Anzahl gänzlich zerstört, was die Frage aufwirft, welche regulatorische Mechanismen dies verhindern.<sup>10</sup> Außerdem ist bei einigen T1D Patienten zu Beginn der Erkrankung (bei Erstmanifestation mit klinisch apparenter Hyperglykämie) festzustellen, dass noch etwa 40-50% der  $\beta$ -Zellen vorhanden sind.<sup>11</sup> Dies könnte eine Erklärung sein, warum trotz Fortschreitens der Erkrankung noch Jahre später eine funktionelle Insulinsekretion vorhanden ist. Abschließend sei noch zu erwähnen, dass bei genauerer Untersuchung der Produktion verschiedener Autoantikörper, der quantitativen Verteilung zwischen Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen, als auch funktionell über die Messung von  $\beta$ -Zellspezifischen Proliferationsraten der Zeitraum zwischen Autoimmunität und symptomatischem Diabetes nicht streng-progredient, sondern zu- und abnehmend im Sinne eines remittierenden oder „relapsing“ Typ 1 Diabetes, verläuft.<sup>12</sup> Eine fortschreitende intensive Auseinandersetzung mit der „prädiabetischen Phase“ bleibt entscheidend, um weitere Studien zur (Sekundär-)Prävention dieser Erkrankung voranzubringen.



**Abbildung 1 Pathogenese des Typ 1 Diabetes nach Atkinson und Eisenbarth, 2001.**

Der Typ 1 Diabetes ist eine Erkrankung, die oftmals familiär gehäuft auftritt, jedoch keinesfalls einem strengen Mendel'schen Vererbungsmuster folgt und somit eine komplexe multifaktorielle Erkrankung darstellt. So konnten schon 1972 erste Studien zeigen, dass erstgradig Blutsverwandte ein 15-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko haben.<sup>13</sup> Dem entgegensetzt ist jedoch das Phänomen, dass etwa 85% der Neuerkrankten keine positive Familienanamnese ausweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es von Relevanz ist, welcher der beiden Elternteile die genetische Prädisposition mitbringt. So liegt die Prävalenz bei Kindern von betroffenen Vätern bei 7%, während es bei Kindern von betroffenen Müttern nur 2% sind.<sup>13</sup> Diese epidemiologischen Beobachtungen verdeutlichen, dass es ein genetisches Risiko gibt und dass bei genauerer Beobachtung auch das Vererbungsmuster eine gewisse Rolle spielt. Bis dato sind etwa 50 Genloci beschrieben, die mit einer erhöhten Inzidenz einhergehen.<sup>14,15,16</sup> Trotz dessen ist kein Gen an sich

ausreichend oder notwendig, um an Diabetes Typ 1 zu erkranken. Die bei weitem höchste Suszeptibilität ist bestimmten Polymorphismen im HLA (humanes Leukozyten Antigen) – System zuzuschreiben, wobei bestimmte Merkmale der Klasse II den höchsten Einfluss haben.<sup>13</sup> Da HLA Klasse II Gene für Proteine der Antigenpräsentation kodieren, weist dies auf einen mutmaßlich kritischen Punkt der Pathogenese hin. Die Mehrheit der T1D Patienten tragen HLA-DR3 oder – DR4 Klasse II Antigene, wobei etwa 30% DR3/DR4-heterozygot sind. Vor allem HLA-DR3 ist außerdem mit anderen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Polyendokrinen Autoimmunsyndrom assoziiert. Bei diesem Erkrankungsbild kann es zu multiplen endokrinen Ausfällen wie etwa einer Hashimoto-Thyreoiditis, einem Morbus Addison als auch T1D kommen. Ein weiteres Suszeptibilitäts-Gen kodiert für CTLA-4. Genau wie CD25 und PTPN22 ist dies ein Molekül, das mit Schlüsselfunktionen innerhalb der Immunantwort in Verbindung gebracht wird und diese reguliert. Zentral ist, dass die Mehrheit an bekannten Suszeptibilitäts-Loci für Moleküle kodieren, die mit der Immunantwort und deren Regulation zu tun haben.<sup>15</sup>



**Abbildung 2** Einflüsse von nicht-HLA-assoziierten Loci in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes. Nach Concannon *et al.*, 2009.<sup>15</sup>

Autoimmunität in Falle des T1D liegt in der Bildung von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Zellen begründet. Die humane Insulinitis ist eine Läsion, über die man bis heute noch sehr wenig weiß. Dies liegt vor allem darin begründet, dass Pankreas-Biopsien aufgrund der intraperitonealen Lage zu gefährlich und

Pankreas-Resektionen post mortem sehr selten sind. Mit dieser Limitation bleibt die Messung von Autoantikörpern die einzige und beste Methode zur Risikobewertung von Menschen mit positiver Familienanamnese und als Diagnostikum des T1D. Wenngleich sie lange nur als „smoke of the fire“ ohne direkte krankheitsrelevante Wirkung betrachtet wurden, sprechen ihr jüngere Studien doch eine nicht unerhebliche funktionelle Rolle, vor allem bei der Präsentation körpereigener Antigene an autoreaktive T-Zellen, zu. So zeigen sowohl die Therapie im NOD-Mausmodell als auch bei Menschen mit B-Zell-depletierenden Antikörpern eine signifikante Verspätung des Erkrankungseintritts.<sup>17</sup> Die Kinetik der Nachweisbarkeit der Autoantikörper ist inzwischen bestens untersucht. So ist etwa bei 70-80% der Patienten bei Erkrankungsbeginn mindestens ein Autoantikörper nachweisbar,<sup>18</sup> während es bei Verwandten ersten Grades 3-4% sind und in der Durchschnittsbevölkerung etwa 0,5%.<sup>19</sup> Jedoch spielen hier Alter, Geschlecht, BMI, Ethnie, geographische Umstände als auch die Sensitivität des Autoantikörper-Assays eine Rolle. Bei genauerer Untersuchung zeigt sich zudem ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Höhe des Titers als auch der absoluten Anzahl der gemessenen Autoantikörpertargets und der Progression der Erkrankung. Beispielweise tragen Individuen, die für zwei Autoantikörper positiv sind, ein 50-60%iges Risiko innerhalb der nächsten 5 Jahre zu erkranken, während es bei Individuen mit drei Autoantikörpern knapp 70% und bei vier knapp 80% sind.<sup>20</sup> Die Liste an Autoantikörpern, die mit dem Typ 1 Diabetes assoziiert sind, ist lang. So gibt es derzeit mehr als 20, von denen ICA, GADA, IAA, IA2A als auch ZnT8A den größten Zusammenhang mit der Prävalenz zeigen und auch am genauesten untersucht sind.<sup>18,20,21</sup>

Ganz im Gegensatz zu den Fortschritten in der Etablierung von Autoantikörper-Messungen und den prädiktiven Aussagen, die diese erlauben, hat man bei der Erforschung der Umwelteinflüsse auf den Typ 1 Diabetes noch viele ungeklärte Fragen. Hierbei gibt es einige Theorien, die den Einfluss bestimmter Faktoren versuchen zu erklären und sich teilweise widersprechen. Die „accelerator hypothesis“ beschreibt die zunehmende Kinds-Fettleibigkeit in den nördlich gelegenen Regionen als Stressor für die  $\beta$ -Zellen, welche sich an einen erhöhten Insulinbedarf anpassen müssen und somit anfälliger für Zellschäden werden und damit einhergehend die zunehmende Prozessierung und



Präsentierung von Autoantigenen fördern.<sup>22</sup> Die oft erwähnte Hygiene-Theorie sieht die verminderte Immunstimulation durch Vermeidung des Organismus von Fremderregern als ursächlich,<sup>23</sup> während die „fertile field hypothesis“ in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit Fremderregern die Entwicklung eines aktivierten Zustands beschreibt, der die Ausbildung von autoreaktiven T-Zellen begünstigt.<sup>24</sup> Durch den Einfluss der Darmflora auf andere Erkrankungen entstand zudem die „old friends hypothesis“, die durch veränderte Darmbesiedlung, Ernährungsgewohnheiten und einer veränderten Darmwandpermeabilität einen direkten Regulator des Immunsystems beschreibt.<sup>25</sup> Abschließend sei noch die „threshold hypothesis“ erwähnt. Diese bietet ein mathematisches Modell, welches aufgrund genetischer Vorbelastung und exogener Gegebenheiten davon ausgeht ein messbares Risiko für die Prävalenz errechnen zu können.<sup>26</sup> Ein kausaler Zusammenhang zwischen viraler oder bakterieller Infektion und Typ 1 Diabetes wird ebenfalls diskutiert. Die besten Beispiele einer Assoziation sind für Rubella und Enteroviren beschrieben, auch wenn diese nicht zweifelsfrei belegt sind.<sup>27,28</sup> Was die Enteroviren angeht, konnte man bei Typ 1 Diabetes Patienten erhöhte Antikörper-Titer und virale RNA innerhalb des Pankreas als auch im Blut nachweisen. Genau wie bei infektiösen Einflüssen wird auch ein Zusammenhang zwischen Ernährung und der Prävalenz berichtet. Hierbei wurde ein Zusammenhang bei verkürzter Stilldauer und verfrühter Gabe von Kuhmilch (vor dem 4. Lebensmonat) beobachtet.<sup>29</sup> Dafür sprechen unter anderem die zahlreichen Fremdproteine wie BSA (*Bovine Serum Albumin*), Casein als auch *bovine insulin*, denen mehrere Untersuchungen eine Rolle in der Pathogenese zusprechen. So wurde beispielweise eine Kreuzreaktivität zwischen Insulin und *bovine α-caseine* berichtet.<sup>30</sup> Allerdings spricht die längere Stilldauer in Entwicklungsländern bei gleichzeitigem Anstieg der Typ 1 Diabetes Inzidenz gegen diese Beobachtung. Bezüglich des Einflusses der Ernährung auf die Inzidenz sei noch Vitamin D zu erwähnen. Eine gute Erklärung für das Nord-Süd-Gefälle wäre der verminderte Vitamin D-Spiegel in der Bevölkerung nördlich des Äquators.<sup>5</sup> Hierfür sprechen unter anderem die verminderten Plasmaspiegel der Patienten zu Erkrankungsbeginn,<sup>31</sup> oder auch der Zusammenhang zwischen erhöhter Inzidenz und Polymorphismen innerhalb eines Gens, das eine Rolle in der Vitamin D-Metabolisierung spielt.<sup>32</sup> Erste

klinische Studien bestätigen diese Hypothese und zeigen einen verbesserten Glucosestoffwechsel als auch eine Zunahme von regulatorischen T-Zellen bei bereits erkrankten Patienten unter einer Vitamin D-Substitution.<sup>33</sup> Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, vor allem um zu klären, ob und über welche Mechanismen ein erhöhter Vitamin D-Spiegel protektiv wirken könnte. Der Vollständigkeit halber müssen an dieser Stelle noch die perinatalen Risikofaktoren erwähnt werden. Diese sind vor allem eine Blutgruppeninkompatibilität (ABO, Rh), Präeklampsie, Neonatale Infektion, Geburt durch Kaiserschnitt, Geburtsgewicht und –lage, als auch mütterliches Alter.<sup>34</sup> Wie oder ob diese den Typ 1 Diabetes wirklich kausal begünstigen, ist bis zu diesem Zeitpunkt Umstand reiner Spekulation.

## **1.2. NOD Maus**

Die Entstehung der NOD Maus geht auf eine Inzucht der Cataract Shionogi Rasse (CTS) in Japan zurück. In der ersten Publikation von Makino *et al.* aus dem Jahr 1980 beschreibt dieser eine Inzucht-Maus, dessen weibliche Vertreter zu etwa 70-80% diabetisch werden, einhergehend mit Glukosurie und Polyurie und wenig später Kachexie. Männliche Mäuse haben jedoch nur eine Diabetesinzidenz von etwa 20%. Dieser Geschlechtsdimorphismus ist zu einem großen Teil hormonellen Einflüssen unterworfen. So erreicht eine Gonadektomie bei männlichen Mäusen eine Erhöhung der Inzidenz auf etwa 80%, während Weibchen nach analoger Intervention eine verminderte Inzidenz von etwa 30% aufweisen.<sup>35;36</sup>

Der wissenschaftliche Erfolg dieser Maus kam in den Folgejahren in den mannigfaltiger Form, einschließlich der Identifizierung von Suszeptibilitäts-Loci und Umwelteinflüssen auf die Entstehung und Pathogenese des murinen und auch humanen T1D. Außerdem lieferte uns die NOD Maus auch Einblicke in die Funktionsweise und Einflusssphären des angeborenen Immunsystems als auch den Beitrag von B-Zellen in eine hauptsächlich durch T-Zellen vermittelte Erkrankung.<sup>37</sup> Als Tiermodell für den humanen T1D teilt die NOD Maus viele pathophysiologische Eigenschaften. Dadurch sind vielerlei Immuninterventionsstrategien entwickelt worden, von denen sich jedoch nur ein kleiner Teil klinisch übertragen ließ.<sup>38</sup> Erste wegweisende Beschreibungen zur Pathogenese des

T1D im Mausmodell stammen von Tarui *et al.* aus dem Jahr 1986.<sup>39</sup> Diabetes in der NOD Maus wird hier als Insulinitis aufgrund von zuvor aufgetretener Leukozyteninfiltration der Langerhans-Inseln beschrieben. Den ersten histologischen Nachweis infiltrierender Leukozyten findet man rund um die pankreatischen Gefäße und sekretorischen Duktuli. Diese Läsion wird als pervasives leukozytisches Infiltrat beschrieben. Hiernach sammeln sich diese Leukozyten an einem oder mehreren Polen vereinzelter Langerhans-Inseln und beginnen das Bild einer Peri-Insulinitis darzustellen, welche sich kurze Zeit später zu einer vollständigen Peri-Insulinitis entwickelt. Zwischen der 5. und 7. Lebenswoche zeigen alle Weibchen eine weitgehend vollständige Insulinitis mit Leukozyten, die bereits das Zentrum der Langerhans-Inseln infiltrieren. Dieses Stadium tritt bei Männchen erst einige Wochen später auf. In der histologischen Untersuchung unserer wildtypischen NOD-Kohorte ist die Manifestation der Insulinitis im Mittel im Vergleich zu diesen Werten leicht verzögert und deutlich weniger synchronisiert. So lag bei acht Wochen alten nicht-diabetischen NOD Weibchen und bei an Diabetes erkrankten NOD Weibchen der mittlere Insulinitis-Score bei 1,36 beziehungsweise 3,66 (Grading 0 bis 4, Dissertation Sarah K. Wegner). An die Phase der T-Zell-Infiltration schließt sich eine Phase der Inselzellproliferation an. So zeigen die Langerhans-Inseln dieser prädiabetischen Mäuse einen größeren Umfang im Vergleich zu der sehr nah verwandten NON/Lt Rasse. Auf funktioneller Ebene zeigt sich ein Rückgang des Insulinspiegels im Alter von 12 Wochen, wobei auch hier die Männchen einige Wochen später nachziehen. Bezeichnend für den selektiven  $\beta$ -Zell-Niedergang zeigen NOD Mäuse hohe Glukagonspiegel. Nach Erkrankungsbeginn werden NOD Mäuse schnell hyperglykämisch und ketonämisch, aber nicht ketoazidotisch.<sup>40</sup> In unserer Kohorte werden erste Weibchen im Alter von 14 Wochen diabetisch und die Inzidenz nimmt in etwa linear zu, bis im Alter von 36 Wochen knapp 90% aller NOD Weibchen erkrankt sind (s. Abb. 12).

Neben der Kinetik der Inselzellläsion ist es weiterhin lohnenswert, die Immunpathogenese der NOD Mäuse zu betrachten.<sup>40</sup> Die ersten Leukozyten im Inselzellinfiltrat sind T- und B-Lymphozyten als auch Makrophagen, wobei die T-Lymphozyten dominieren. Die Diabetogenese ist an sich T-Zell-abhängig und zu einem überwiegenden Teil T-Zell-vermittelt. Zur Initiation der Inselzellläsion

sind sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen notwendig, wobei aufgereinigte CD4+ Zellen von diabetischen Spendern im Gegensatz zu CD8+ Zellen von selbigen Spendern einen Diabetes in unbestrahlte NOD.*scid* Empfänger transferieren können sollen.<sup>41</sup> NOD.*scid* Mäuse haben aufgrund einer Mutation des PRKDC-Gens (DNA-abhängige Proteinkinase, katalytische Untereinheit) einen kombinierten DNA-Reparaturdefekt und Defekt des Rearrangements zur Ausbildung Antigen-spezifischer Rezeptoren. Dies macht sie unfähig, funktionelle T- und B-Lymphozyten auszubilden, weshalb sie inhärent vor Autoimmundiabetes geschützt sind.<sup>42</sup> Christianson *et al.* berichten, ein adoptiver Transfer von CD4+ Zellen diabetischer Spender löse bei (aufgrund des Fehlens eines adaptiven Immunsystems nicht sensibilisierbaren) kombiniert immundefizienten, MHC isogenen NOD.*scid* Mäusen einen Diabetes aus. Prä-diabetische CD4+ T-Zellen hingegen, also sensibilisierte T-Zellen, deren Träger aber noch keinen Diabetes entwickelt hatte, seien nicht in der Lage, Diabetes zu transferieren. Eine konkrete Erklärung für diese partiell widersprüchlichen Beobachtungen wird nicht angeboten. Interessanterweise seien sensibilisierte CD8+ Zellen allein nicht dazu befähigt, in NOD.*scid* Mäusen einen T1D auszulösen. Makrophagen innerhalb des Infiltrats sind offenbar für die Rekrutierung weiterer T-Lymphozyten verantwortlich und aktivieren diese. Eine zweite größere Welle an Leukozyten erreichen die Langerhans-Inseln zwischen der 10. und 12. Lebenswoche. Zu diesem Zeitpunkt ist eine relevante Anzahl an CD4+ Zellen nachzuweisen. Im Laufe der Sensibilisierung und des Epitope-Spreadings reagiert das NOD-Immunsystem auf immer mehr  $\beta$ -Zell-Antigene, wie beispielsweise Insulin, GADA, IGRP als auch endogene retrovirale Genprodukte.<sup>40</sup>

Neben den T-Lymphozyten zeigen auch die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) der NOD-Mäuse pathologische Züge. APCs spielen eine zentrale Rolle des Immunsystems. So haben sie einen großen Einfluss auf die Entwicklung des T-Zell-Repertoires durch intrathymische Präsentation von Selbst-Antigenen und ebenso durch die Präsentation prozessierter Peptide durch ihre MHCII-Moleküle (Major histocompatibility complex II) an antigenspezifische T-Zellen. In der NOD Maus sieht man eben diese Funktionen der APCs gestört. So sind sie offenbar nicht in der Lage, T-Suppressor-Zellen in der Peripherie zu aktivieren, genauso wie es ihnen nicht gelingt, die Entwicklung  $\beta$ -Zell-spezifischer T-Zellen

im Thymus zu unterdrücken. NOD Mäuse zeigen mit zunehmendem Alter Infiltrate in verschiedensten Organen. Außerdem ist zu erwähnen, dass NK-Zellen in diesem Stamm vorhanden, aber nicht funktionsfähig sind. Dies sind gleichzeitig die größten Unterschiede zwischen der NOD-Maus und der BioBreeding (BB) rat, welche ein alternatives Modell für die Erforschung des T1D darstellt, sich jedoch im Vergleich zur NOD Maus durch eine Lymphopenie auszeichnet.<sup>40</sup>

Als multifaktorielle Erkrankung spielt die genetische Prädisposition auch bei der NOD-Maus eine vorrangige Rolle mit zahlreichen bisher identifizierten Genloci. Das bei weitem wichtigste Gen im Rahmen der Diabetogenese ist das Major histocompatibility complex. Klasse I und II-Moleküle werden sowohl für die Positiv- als auch Negativselektion von autoreaktiven T-Zellen benötigt und stellen hierbei in der „binding groove“ für die T-Lymphozyten präsentierte Antigene bereit. Beispielweise ist das MHCII-Ag7 Allel essentiell für die Pathogenese des Diabetes der NOD Maus, während andere Allele wie MHCII-Ek protektiv wirken.<sup>40</sup> Das Äquivalent dieser Moleküle im Menschen ist die Human Leukocyte antigen-Region, welche ebenfalls bestimmte Polymorphismen aufweisen kann, von denen manche für Autoimmungeschehen prädisponieren, während andere protektiv wirken. Die genaue Einschätzung der verschiedenen Allele hat sich zum Screening von Individuen für klinische Präventionsstudien als sehr hilfreich erwiesen. Des Weiteren erkranken etwa 20% der Menschen mit einer Spontanmutation im *autoimmune regulator gene* (AIRE), welches direkt die intrathymische Insulin-Expression der Epithelzellen in der Medulla kontrolliert, an T1D.<sup>43</sup> Dies unterstreicht die Hypothese eines Defekts der Negativselektion von insulinreaktiven T-Zellen im Thymus. Dafür spricht außerdem der Nachweis von insulinspezifischen CD4+ Zellen aus den Pankreata von 8 Wochen alten NOD-Weibchen. Weitere Untersuchungen zeigen einen zunehmenden Verlust an Immuntoleranz gegenüber multiplen Epitopen und deuten somit darauf, dass es wahrscheinlich nicht ausreichend ist, gegen ein Inselzellantigen sensibilisiert zu sein, sondern mehrere zur Beförderung der Insulitis von Nöten sind. Interessanterweise verhindert die Toleranz gegenüber Proinsulin die Ausbildung IGRP-spezifischer T-Zellen in der NOD Maus, wenngleich das Fehlen IGRP-spezifischer Zellen nicht ausreicht, das Fortschreiten des Diabetes zu verhindern.<sup>44</sup> Zusätzlich gibt es

noch dutzende Allele, die jedes mit einer erhöhten Diabetesinzidenz einhergehen. Die meisten sind direkt oder indirekt mit der T-Zell-vermittelten Inselzellzerstörung verbunden, konnten jedoch nicht im Einzelnen genutzt werden, um gezielte Therapiestrategien zu entwickeln. Es scheint sich also um eine Reihe von „Immundefekten“ zu handeln, die im Zusammenspiel die Immunregulation behindern. Betroffen sind u.a. Genloci wie IL-2, IL-2ra (CD25), CTLA-4, PTPN22 und Pdca1 (PD-1).<sup>15</sup>

Des Weiteren ist die Erkrankungsrate des NOD Stammes auch exogenen Einflüssen unterworfen. Hier zeigte sich schon sehr früh, dass gewisse mikrobielle Stimuli die Diabetesinzidenz verringern, beispielsweise Injektionen von Mykobakterien oder anderer Erreger. Jüngere Studien konnten zudem aufzeigen, dass die Zusammensetzung der Darmflora von NOD Mäusen einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung eines Diabetes haben kann. Hierbei ist vor allem das MyD88-Gen in Erscheinung getreten. Als Regulator einer Reihe von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, welche mikrobielle Stimuli erkennen, wirkt sich ein Knockout des MyD88-Gens durch eine veränderte Darmflora protektiv aus. Zusätzlich gibt es viele weitere Faktoren, die sich auf die Inzidenz des NOD-Stamms auswirken.<sup>45</sup> Beispielsweise verringert Vitamin D im NOD-Modell nachweislich die Diabetesinzidenz und ist deshalb auch bereits Gegenstand klinischer Studien.<sup>33</sup> Abschließend sei erwähnt, dass sich Hinweise häufen, die diversen viralen Erregern eine Rolle in der Pathogenese des T1D zusprechen. Diese scheinen durch molekulare Mimikry oder direkten Einfluss auf die Selbst-Toleranz des angeborenen Immunsystems durch dessen Aktivierung einen Trigger darzustellen.<sup>46</sup>

Seit der Veröffentlichung der NOD-Maus 1980<sup>35</sup> bis hin zum Jahr 2004 wurden mehr als 463 potenziell immunmodulierende Substanzen in über 321 Publikationen im NOD Modell untersucht.<sup>38</sup> Diese Reagenzien können in Adhäsionsmoleküle, Zellsuspensionen und Antigene bis hin zu Immunmodulatoren, Zytokinen, Hormonen und pathogenen Erregern unterteilt werden. Interessanterweise haben viele dieser Reagenzien keinen und einige sogar einen ungünstigen Effekt auf die Inzidenz. Bei genauer Analyse stellt man zudem fest, dass die Therapieeffizienz abhängig von der Krankheitsphase bzw. dem Lebensalter unterschiedlich ist. Anti-CD40 gehört zu Ersteren.<sup>47</sup> Eine Behandlung von 3 Wochen alten NOD Weibchen ist präventiv, während 9-10

Wochen alte NOD Weibchen nur zu einem Anteil von der Therapie profitieren. Dies spricht entweder für die Rolle des CD40-CD40L-Pathway zu Erkrankungsbeginn oder der Rolle von Dosis und Dauer der Behandlung, da in diesem Beispiel die Dosis bei der älteren NOD-Kohorte nicht angepasst wurde und die Therapiedauer sogar kürzer war. Zu Letzteren gehört TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), welches bei unmittelbar postnataler Gabe die Inzidenz erhöht jedoch bei Gabe jenseits der 4. Woche protektiv wirkt.<sup>48</sup> Von den 463 Therapeutika wurden nur 23 in diabetischen NOD Mäusen getestet und nur 16 dieser 23 hatten einen kurativen Effekt. In Anbetracht der Tatsache, dass heute noch bei weitem die meisten T1D-Studienteilnehmer zu Beginn der Studie bereits diabetisch sind, ist der Bedarf an protektiven Therapeutika für diesen Zeitpunkt immens.

### **1.3. Das $\alpha$ 4-Integrin – Molekularbiologie, Immunologie, pharmakologische und genetische Modelle**

Das *very-late-antigen-4* (VLA-4) ist ein Integrin, das sich aus den beiden Einheiten  $\alpha$ 4 und  $\beta$ 1 zusammensetzt. VLA-4 wird auf der Oberfläche der meisten mononukleären Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten, als auch auf nichthämatopoetischen Tumorzellen exprimiert. Integrine sind Transmembranrezeptoren, welche grundlegend aus zwei Untereinheiten bestehen und in vielerlei Kombinationen nichtkovalente Bindungen zu Heterodimeren eingehen. Diese Untereinheiten werden in zwei Familien ( $\alpha$  und  $\beta$ ) unterteilt, welche wiederum 15 und 8 verschiedene Untereinheiten besitzen.<sup>49</sup> Der Name „Integrin“ geht auf ihre Rolle in der Integrierung der extrazellulären Matrix mit dem Zytoskelett der Zellen zurück.

Der Hauptligand von VLA-4 ist das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), welches auf Endothelzellen exprimiert wird. Ein weiterer Ligand ist das CS1-Motiv von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin (Fn), die abgesehen vom Bindegewebe auch im Plasma nachgewiesen werden können. Um jedoch eine aktive Bindung zu Fn einzugehen, ist eine höhere Aktivität von VLA-4 von Nöten. Die Expression des Hauptliganden VCAM-1 auf Endothelzellen kann von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen hochreguliert werden und erleichtert somit dem Immunsystem den Zugang zu Inflammationsherden.<sup>50</sup>

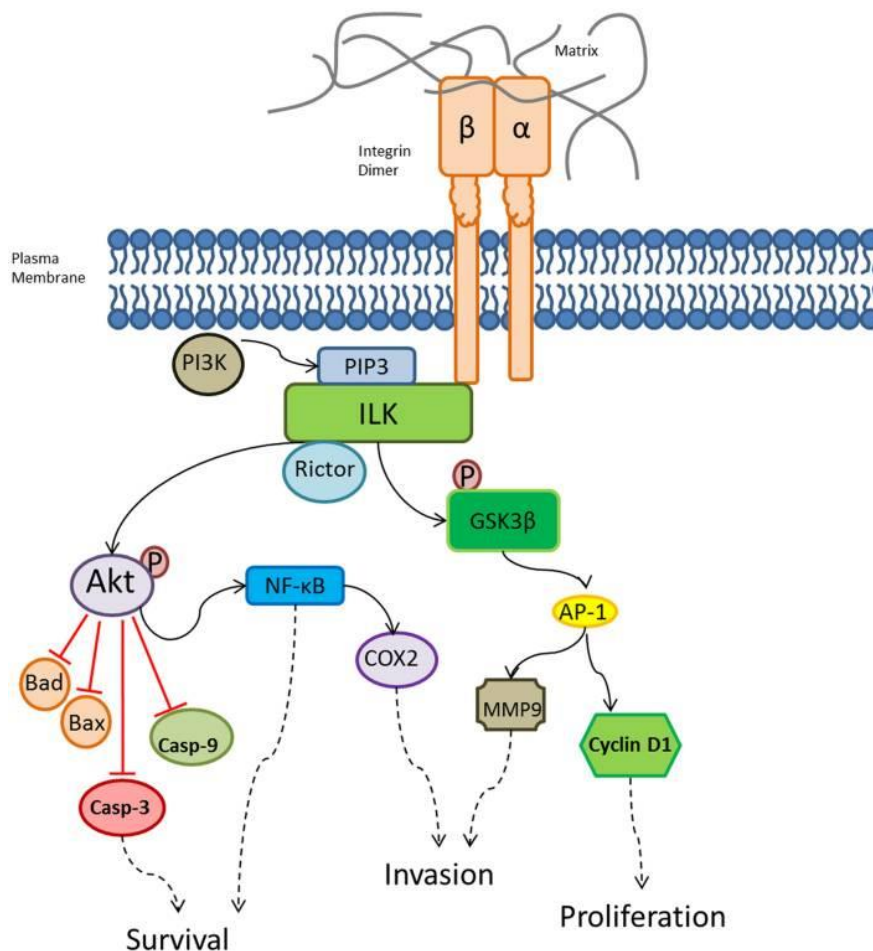
$\alpha 4$  ist alternativ in der Lage, mit der Untereinheit  $\beta 7$  ein Heterodimer zu bilden. Das Heterodimer  $\alpha 4\beta 7$  interagiert unter anderem mit denselben Liganden wie  $\alpha 4\beta 1$  (VCAM-1, Fn), wobei diese Interaktionen im Vergleich schwächer ausgeprägt sind. Der Hauptligand von  $\alpha 4\beta 7$  ist das *mucosal-addressin cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) und befindet sich vor allem im Gastrointestinaltrakt. Zellen mit homogener  $\alpha 4\beta 7$  Expression sind NK-Zellen, eosinophile Granulozyten als auch B- und T-Zellen von Neugeborenen. B- und T-Zellen im adulten Organismus zeigen eine eher heterogene  $\alpha 4\beta 7$ -Expression. MAdCAM-1 wird auf jeglichen Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben exprimiert und erlaubt den dort ankommenden Leukozyten das Homing. In diesem Rahmen wird MAdCAM-1 eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität der Darmmukosa einschließlich der Immunfunktion zugesprochen.<sup>49</sup>

Zur Immun-Surveillance gehört eine adäquate Rekrutierung von Lymphozyten zum Inflammationsherd. Im physiologischen Zustand verlassen nur vereinzelte Lymphozyten das Peripherblut, um Bindegewebe oder Organe zu infiltrieren. Wenn allerdings eine Inflammation entsteht, geht dies mit der Freisetzung von Inflammationsmediatoren wie Zytokinen und Chemokinen aus aktivierten T-Zellen oder residierenden Monozyten einher. Diese Signale verleiten das benachbarte Endothel dazu die Dichte an VCAM-1 auf der Oberfläche zu erhöhen und erleichtern somit den zirkulierenden Leukozyten die Adhäsion und Migration ins Gewebe. Wie genau dies passiert, ist im Detail noch nicht ganz verstanden. Den Prozess kann man biomechanisch in sequenzielle Phasen unterteilen. Das physiologische „*tether and rolling*“ der Leukozyten auf der Endotheloberfläche wird innerhalb von Millisekunden durch stimulierende Signale der oberflächengebundenen Chemokine des Endothels an die Leukozyten beendet. Diese Chemokine führen zu einem Remodelling des Zytoskeletts und einer verstärkten VLA-4/VCAM-1-Bindung, die letztendlich zur Adhäsion führt. Hierbei spielen sowohl „*high affinity states*“, die durch den Einfluss der Chemokine auf die Konformation des Integrins entstehen, als auch die Ausstattung an GPCRs eine wichtigere Rolle als der Zelltyp der Leukozyten. Die „*affinity changes*“ finden innerhalb von Sekunden statt und sind reversibel. Anschließend können die Leukozyten in einem Diapedesis genannten Vorgang durch das Endothel und anschließend ins Interstitium migrieren. Interessant ist



zudem, dass das  $\alpha 4$ -Integrin an allen vier Phasen direkt und indirekt beteiligt ist, indem es zusätzlich eine  $\beta 2$ -abhängige Adhäsion und Diapedesis fördert. Im Bindegewebe angekommen, können Leukozyten Fibronectin binden und zur Proliferation oder Zytokinproduktion führen.<sup>51</sup>

Wie bereits erwähnt, spricht man von niedrigen und hohen Affinitätszuständen. Initial geht man bei jeder VLA-4/VCAM-1 Bindung von einem „*low affinity state*“ des VLA-4 aus. Erst die Aktivierung der Leukozyten durch Chemokine führt zu einer Konformationsänderung und zum „*high affinity state*“. Neben dieser Art der Aktivierung sind ebenfalls Induktionen durch Antigene, anti-CD3-Antikörper, Phorbol ester,  $Mn^{2+}$  und  $\beta 1$ -spezifische-Antikörper beschrieben. Neben der Bindung des Oberflächenrezeptors spielt auch die zytoplasmatische Domäne eine Rolle in der Regulierung der Zelladhäsion. Hier konnte gezeigt werden, dass Paxillin, ein 68kDa-Protein des Zytoplasmas, die zytoplasmatische Domäne der  $\alpha 4$ -Untereinheit binden und regulieren kann und somit direkt Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von Leukozyten hat. Neben diesem „Inside-out“ Signal ist die zytoplasmatische Domäne in der Lage, den Zelltod als auch das Zytoskelett zu beeinflussen und die Genexpression zu verändern.<sup>52</sup>



**Abbildung 3** Intrazelluläre  $\alpha 4$ -Integrin-vermittelte Signalwege und deren Regulation durch ILK (integrin-linked-kinase) nach Shishido *et al.*, 2014.

Um die Rolle des  $\alpha 4$ -Integrins in der Hämatopoese zu untersuchen, wurde von Scott *et al.* 2003 eine konditionelle Knockoutmaus generiert.<sup>53</sup> Konstitutive Deletion von  $\alpha 4$ -Integrin ist früh embryonal letal. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass  $\alpha 4$  auf zahlreichen nichtlymphatischen Geweben im sich entwickelnden Embryo exprimiert wird. Im konditionellen Knockout konnte im Peripherblut eine dauerhafte achtfach erhöhte Anzahl hämatopoetischer Vorläuferzellen gezeigt werden, welche sich in abgeschwächter Form auch in der Milz darstellte. Außerdem konnten beachtliche Homing- und Engraftment-Defekte beobachtet werden, die in den zuvor generierten  $\alpha 4$ -null Chimären nicht untersucht werden konnten. Empfänger von  $\alpha 4$ -/- Blutstammzelltransplantaten zeigen zudem eine gestörte Repopulation von T-Zellen im Thymus und eine verminderte Rekonstitution der lymphatischen Gewebe des Darms. Des Weiteren konnten verminderte IgM- und IgE-Spiegel und eine erhöhte IFN $\gamma$ -Antwort auf Ovalbumin beobachtet werden. Letzteres

fürten die Autoren auf eine gestörte Interaktion zwischen B- und T-Zellen zurück.<sup>54;55</sup>

Außerdem wurde ein genetischer Knockout genutzt, um die Rolle von  $\alpha 4$  in der Pathogenese des allergischen Asthmas zu untersuchen. Diese Studie konnte aufzeigen, dass in der  $\alpha 4^{-/-}$  Maus eine bronchio-alveoläre Stimulierung mit potenziellen Allergenen nicht ausreichend ist, um ein Asthma auszulösen.<sup>56;57</sup> Zudem konnte festgestellt werden, dass durch Ovalbumin-Behandlung sensibilisierte  $\alpha 4$ -kompetente CD4<sup>+</sup> Zellen in der Lage sind allergisches Asthma in die  $\alpha 4^{-/-}$  Maus adoptiv zu transferieren. Es genügt offenbar,  $\alpha 4$  im hämatopoetischen Kompartiment zu exprimieren, da die  $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger im vaskulären Kompartiment  $\alpha 4$ -defizient sind. Andererseits konnte der adoptive Transfer von  $\alpha 4$ -inkompetenten CD4<sup>+</sup> Zellen eines zuvor mit Ovalbumin behandelten  $\alpha 4^{-/-}$  Spenders kein Asthma in wildtypischen Empfängern auslösen. Interessanterweise verhindert der  $\alpha 4$ -Mangel zudem die VCAM-1 Hochregulation in betroffenen Gefäßen. Hinsichtlich der immunologischen Antwort auf Ovalbumin wurde eine verminderte Sensibilisierung der T-Zellen gemessen, genau wie eine verminderte IgE-Produktion *in vivo*. Andererseits konnte eine VCAM-1 Defizienz nicht vor allergischem Asthma schützen und somit zugleich auf die Interaktion von  $\alpha 4$  mit anderen Liganden hinweisen. Unklar bleibt ob eine Sensibilisierung der  $\alpha 4$ -inkompetenten T-Zellen stattgefunden hat, ein etwaiger Selektionsdefekt in Thymus oder Lymphknoten vorliegt oder ob eine Sensibilisierung stattgefunden hat, die T-Zellen aufgrund der  $\alpha 4$ -Defizienz jedoch nicht in der Lage waren, in das Lungenparenchym zu migrieren und dort wirken zu können.<sup>56;57</sup> Außerdem wurde die  $\alpha 4$ -Blockade noch im EAE und Colitis-Modell erfolgreich untersucht und ist heute fester Bestandteil der Therapie von an Multipler Sklerose und Morbus Crohn erkrankten Patienten.<sup>58;59</sup>

Bisherige Interventionen bezüglich des  $\alpha 4$ -Integrins in der NOD Maus waren stets Antikörper-vermittelt. Die beiden informativsten Studien dazu stammen aus dem Jahr 1994 und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Baron *et al.* injizierten Splenozyten von diabetischen Spendern in bestrahlte NOD-Weibchen und behandelten diese vor dem Transfer *in vitro* mit Antikörpern gegen  $\alpha 4$ , VCAM-1 und ICAM-1. PS1/2, ein anti-funktioneller Antikörper gegen  $\alpha 4$ , verminderte die Inzidenz von 95% auf 30% und verzögerte dosisabhängig den

Erkrankungsbeginn um bis zu 17 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe. VCAM-1 Blockade zeigte eine schwächere Wirkung und ICAM-1, im Kontrast zu bisherigen Erfolgen im EAE-Modell, keinen Effekt. Jedoch unterschied sich keine der Kohorten bezüglich der T-Zell-Antwort auf Inselzelllysate *in vitro*. Darüber hinaus war die mit PS1/2 behandelte Gruppe die einzige, die eine signifikant verminderte Insulitis zeigte.<sup>60</sup> Yang *et al.* behandelten fünf Wochen alte NOD-Weibchen über sieben Wochen mit einem Antikörper gegen  $\alpha 4$  oder L-Selectin in zwei verschiedenen Dosen. Die anti- $\alpha 4$ -Therapie führte zum vollständigen Schutz vor Insulitis und die anti-L-Selectin-Therapie zu einer verminderten Insulitis. Für beide Antikörper war eine Dosisabhängigkeit zu beobachten. Auch im adoptiven Transfermodell waren beide Antikörper protektiv, für anti-CD62L partiell, für anti- $\alpha 4$  sogar vollständig, wobei das Follow-Up nur 35 Tage betrug und die Kohorte nur fünf Weibchen pro Gruppe umfasste. Auch in diesem Falle gab es keine Unterschiede bezüglich der Proliferationsantworten auf Inselzellantigene *in vitro*.<sup>61;62</sup> Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Suppression der Immunantworten durch die genannten Interventionen. Kommjosa *et al.* veröffentlichten 2001 eine Studie, in der sie einen Cocktail an Antikörpern (anti- $\alpha 4$ , anti- $\beta 2$ , anti- $\beta 7$ ) der Monotherapie mit anti- $\alpha 4$  gegenüberstellten. Durch den Cocktail an Antikörpern konnte die Erkrankung nach adoptiven Transfer von Splenozyten verhindert werden, während die anti- $\alpha 4$  Therapie die Inzidenz von 86% auf 63% 52 Tage nach Transfer reduzierte. Zudem konnte die Therapie mit multiplen Antikörpern die Inzidenz des spontan auftretenden Diabetes von 71% auf 17% verringern, während die anti- $\alpha 4$ -Therapie die Inzidenz auf 33% reduzierte. Eine Protektion gelang ohnehin nur dann, wenn die Therapie in einem Alter von sieben Tagen begonnen worden war. Therapieversuche ab einem Alter von 40 oder sogar 70 Tagen waren bei weitem weniger erfolgreich. Des Weiteren konnten Kommajosa *et al.* beobachten, dass das Leukozyteninfiltrat um die Langerhans-Inseln nach der Therapie eine veränderte Expression an IFN- $\gamma$ , IL-4 und iNOS zeigten.<sup>63</sup> Abschließend sei zu erwähnen, dass Uniyal *et al.* 1999 untersuchten, welche Effekte die Injektionen von anti- $\alpha 4$  und anti- $\alpha 5$  auf die Insulitis von zehn Wochen alten Weibchen als auch diabetischen Mäusen haben. Während die Effekte in diesem Alter relativ gering waren und nur eine geringe Reduktion der Insulitis gezeigt werden konnte, beschreiben sie neben

einem additiven Effekt durch anti- $\alpha 5$ -Therapie eine zügige Zunahme der Insulinitis nach Therapieende mit beiden Antikörpern und beschreiben somit die temporäre Wirkung dieser Antikörper-Therapien.<sup>64</sup>

#### **1.4. Zielsetzung dieser Arbeit**

Bisherige Daten aus unserem Labor hatten an einer Kohorte von zehn  $\alpha 4^{-/-}$ -NOD Weibchen eine vollständige Protektion gegen Insulinitis und Entstehung eines T1D gezeigt, während die wildtypischen Wurfgeschwister der Frankfurter NOD Kolonie mit einer annähernd linear ansteigenden Prävalenz zwischen den Wochen 14 und 36 bis auf etwa 90% an T1D erkrankten. Durch den konditionellen Knockout des  $\alpha 4$ -Integrins auf dem Hintergrund der NOD Maus gelingt es, diese vor einer T1D Erkrankung zu schützen. Dieser Knockout ermöglicht es, die vollständige  $\alpha 4$ -Blockade, ohne die durch die Antikörper-Therapie entstehenden Nebenwirkungen, in diesem Modell zu untersuchen. Frühere Studien deuten darauf hin, dass die protektive Wirkung der  $\alpha 4$ -Blockade auf einem Migrationsdefekt beruht. Der Ausschluss von anderen Wirkungen, wie zum Beispiel eine beeinträchtigte Lymphknoten-zirkulation oder beeinträchtigte Interaktionen zwischen Leukozyten-Subgruppen können durch die Antikörper-Therapien nicht beantwortet werden. Die Beantwortung dieser und weiterer Fragen in der Pathogenese und Prävention des T1D in der NOD Maus erfordern eine möglichst vollständige Blockade von  $\alpha 4$ , welche wir durch die unter dem Tie2-Promoter exprimierte Cre-Rekombinase-vermittelte Deletion des Itga-4-Gens erreichen.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir den beschriebenen Effekt der Diabetes Protektion durch den  $\alpha 4$  Knockout in einer zweiten Kohorte bestätigen. Zweitens möchten wir, neben der Untersuchung genereller Immunreaktionen, Inselzellantigen-spezifische T-Zellen im CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Kompartiment als auch Autoantikörper-Titer zur Überprüfung einer etwaigen humoralen Immunantwort gegen Inselzellantigene bestimmen. Drittens soll die Übertragbarkeit des Diabetes durch adoptiven Transfer bestimmter T-Zellen als auch die Wirksamkeit einer Sekundärprophylaxe durch hämatopoetische Stammzelltransplantation von  $\alpha 4$ -kompetenten Empfängern mit  $\alpha 4$ -inkompetenten Spenderknochenmarks-zellen überprüft werden. Schließlich

zeigt die NOD-Maus auch das Krankheitsbild einer Sialitis. Hier möchten wir untersuchen, ob und wie sich diese in der NOD. $\alpha$ 4-/-Maus darstellt.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

**Tabelle 1. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
ACCU-CHECK Aviva	Roche Diabetes Care, Mannheim
ACCU-CHECK Aviva Teststreifen	Roche Diabetes Care, Mannheim
ARCHITECT i1000SR	Abbot, Abbot Park, IL, USA
AutoMACS pro immunomagnetischer Zellsortierer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EH4 basic Wasserbad	IKA, Staufen
FACSAria II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
FACSFortessa LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus, Tokyo-Shinjuku, Japan
Gefrierschrank MDF-53V (-80 °C)	Sanyo, Osaka, Japan
Gefrierschrank ÖkoArctis (-20 °C)	AEG, Frankfurt am Main
Gel Doc XR+ Transilluminator	BioRad, Dreieich
Gelelektrophoresekammer Power Pac Basic	BioRad, Dreieich
Holton Safe 2010 1.2 Sterilwerkbank	Thermo Scientific, Karlsruhe
IVIS Lumina II Lichtmikroskop	Caliper Life Science, PerkinElmer, USA
Multi-Cell 3/LV Hemavet Hämazytometer	Drew Scientific, Miami Lakes, USA
Nanodrop Spektralphotometer	ChemoMetec, Allerød, Dänemark
pH/ORP-Meter HI2211	Hanna Instruments, Vöhringen
Rotina 420(R) Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Thermocycler ‚My Cycler‘/, ‚Gradient Cycler‘	Applied Biosystems, Foster, USA
ThermoForma Sterile-Cycle CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermomixer R	Eppendorf AG, Hamburg
Victor X4 Plattenlesegerät	Perkin Elmer, Waltham, USA

#### 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
10x FD Green Buffer	ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
7-Aminoactinomycin D (7-AAD) Viability Dye	BD, Heidelberg
Agarose	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Ampicillin	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt

Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Cytofix/Cytoperm™	BD, Heidelberg
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28 für T-Zell Expansion und Aktivierung	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
eBioscience™ 1X RBC Lysis Buffer	Thermo Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
Ethidiumbromidlösung (1%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
FastDigest BamHI	ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
FastDigest NotI	ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
Fetal Calf (bovine) Serum (FBS)	PAA Laboratories, Pasching
Fixation/Permeabilization Diluent	ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
Fixation/Permeabilization Konzentrat	ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
Formaldehyd 10%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
Glutamat (100x)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
GolgiPlug – Protein Transport Inhibitor	BD, Heidelberg
HBVAXPRO (10 ug/mcg)	Sanofi-Pasteur, Swiftwater, PA, USA
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
IGRP Catalytic Subunit - related Protein (206 – 214; VYLKTNVFL)	AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA
Ionomycin aus <i>Streptomyces conglobatus</i>	Merck, (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Kollagenase IV aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Paramethoxyamphetamin (PMA)	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Perm/Wash™ Buffer	BD, Heidelberg
Permeabilization Buffer 10X	ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA
Polyethylenimin (PEI)	Merck, (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Protaminsulfat	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Recombinant Murine IL-2	PEPROTECH, Rocky Hill, NJ, USA
REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
Streptozotocin	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypsin	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
VivoGlo luciferin	Promega, Madison, WI, USA

### 2.1.2. Medien

**Tabelle 3. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Medien**

Medien	Zusätze	Hersteller
RPMI 1640 (1x, +L-Glutamate)		Gibco, Life Technologies, Darmstadt
RPMI++	Penicillin/Streptomycin (1%)	

	FCS (10%)	
PBS (1x), without Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>		Gibco, Life Technologies, Darmstadt
PBS/BSA	BSA (0,5%)	
MACS Puffer	PBS BSA (0,5%) EDTA (2mM)	
DMEM, high glucose, GlutaMax		Gibco, Life Technologies, Darmstadt
DMEM ++	Penicillin/Streptomycin (1%) FCS (10%)	
TAE Puffer		Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
LB-Medium	Ampicillin (100 µg/ml)	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt
HBBS		Gibco, Life Technologies, Darmstadt
HBBS ++	Kollagenase IV 1mg/ml HEPES (25 µM)	
Natriumchlorid-Lösung (0.9%)		B. Braun, Melsungen

#### 2.1.4. Kits

**Tabelle 4. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits**

Kit	Hersteller
CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD8+ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mouse IAA ELISA Kit	Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Texas, Houston, USA
Pan T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
XChange Plasmid Maxi Kit, pEqGOLD	Peqlab, Erlangen

#### 2.1.5. Antikörper

**Tabelle 5. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper**

Antigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD3e	17A2	eFluor450 APC FITC AF700	Biolegend
CD4	GK1.5	APC-Cy7 PE BV510	Biolegend
CD8	53-6.7	FITC PerCP-Cy5.5	Biolegend



		APC BV510	
CD11b (Mac1)	M1/70	PerCP-Cy5.5 FITC	Biolegend
CD24	M1/69	BV421	Biolegend
CD25	PC61.5	APC	eBioscience
CD43	S11	APC	Biolegend
CD44	IM7	AF700	Biolegend
CD45	30-F11	FITC eFluor450	Biolegend
CD45R (B220)	RA3-6B2	PE-Cy7 APC/Cy7	Biolegend
CD49d	R1-2	PE	Biolegend
CD62L	MEL-14	PE	BD Biosciences
CD127	SB/199	FITC	Biolegend
CD197	4B12	PerCP-Cy5.5	Biolegend
CD249 (BP-1)	6C3	PE	Invitrogen
CD335	29A1.4	PE-Cy7	Biolegend
FoxP3	150D	PE	
IFN $\gamma$	XMG1.2	PE FITC	eBioscience Biolegend
IgD	11-26c.2a	BV510	Biolegend
IgM	R6-60.2	FITC	BD Biosciences
Ly-6G (Gr1)	RB6-8C5	APC	Biolegend
MHCI-Dextramer		PE	Immudex
MHCII-Tetramer	I-A(g7) – B:9-23	PE	NIH Tetramer Core Facility
TCR- $\beta$ Chain	H57-97		Biolegend

### 2.1.6. Mäuse

Die NOD.CD49df/f.Tie2cre+ Maus wurde in Vorbereitung der hier beschriebenen Arbeit im Labor durch Rückkreuzen der C57Bl/6.CD49df/f (Geschenk von Th. Papayannopoulou, Univ. of Washington, Seattle, WA) und C57Bl/6.Tie2cre (Jax Laboratory - USA, Bar Harbor, Maine) über 10 Generationen bis zur Reinerbigkeit generiert.<sup>53</sup> Die NOD.CD49df/f.Tie2cre+ Maus, im Verlauf NOD. $\alpha$ 4-/- genannt, und NOD.CD49df/f.Tie2cre-Wurfgeschwister, im Verlauf nur als NOD bezeichnet, wurden im Vivarium der Goethe Universität unter konventionellen (nicht-SPF) Bedingungen in offener Käfighaltung mit Futter und Wasser ad libitum gehalten. Alle Mäuse, die mind.  $\alpha$ 4 haplosuffizient sind, werden als „NOD“ oder „NOD-WT“ bezeichnet. Alle Mäuse, die f/f cre+, f/ $\Delta$  cre+ oder  $\Delta/\Delta$  cre+ oder cre- sind und zusätzlich durchflusszytometrisch nachgewiesen auf ihren Leukozyten  $\alpha$ 4-insuffizient ( $\alpha$ 4-

negativ) sind, werden als „NOD. $\alpha$ 4-/-“, bezeichnet, obwohl die Ablation sich selbstverständlich inhärent auf die hämato-endotheliale Linie beschränkt, da nur hier die cre-Rekombinase aktiv werden kann. Die Genotypisierung der Wurfgeschwister erfolgte im Alter von drei Wochen durch Entnahme von Schwanzbiopsien zur Extrahierung und Reinigung genomischer DNA aus dem Mausgewebe. Die genomische DNA wurde daraufhin durch PCR-Untersuchungen analysiert und interpretiert (s. 2.2.4.1).

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Tier-Experimente

#### 2.2.1.1. Blutzucker-Messung

Die Blutzucker-Messung erfolgte durch Punktion der *Vena facialis* mit einer 20G-Kanüle, der Aufnahme eines Blutropfens durch Blutzucker-Teststreifen und anschließender Messung durch ACCU-CHECK Aviva. Die Diabetes-Diagnose erfolgte nach Blutzucker-Messung über 150 mg/dl an zwei aufeinanderfolgenden Tagen oder einmaligem Blutzucker über 200 mg/dl.<sup>60</sup>

#### 2.2.1.2. Blut- und Organentnahmen

Blutentnahmen erfolgten durch Punktion der *Vena facialis* mit einer 20G Kanüle. Das Blut wurde in Natrium/EDTA-Röhrchen (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt und bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Entnahme der inneren Organe erfolgte unmittelbar nach schmerzloser Tötung durch zervikale Dislokation. Auf die Desinfektion der fixierten Spender folgte ein Medianschnitt von Kinn bis Becken und die Präparation von Milz, Pankreas und *Glandulae Submandibulares*. Zur Präparation von Femur, Tibia und Pelvis erfolgte ein medialer Längsschnitt von Leiste bis Sprunggelenk mit anschließender Freilegung der Knochen und stumpfem Ablösen der umgebenden Muskulatur. Alle Organe wurden anschließend in PBS/BSA bis zur Verarbeitung oder Formalin-Fixierung aufbewahrt. Organe, die histologisch untersucht werden sollten, wurden für 48

Stunden in 4% Formaldehydlösung aufgenommen und anschließend in PBS/BSA bis zur Paraffin-Einbettung aufbewahrt.

#### 2.2.1.3. Erythrozyten-Lyse

Erythrozyten wurden durch eine hypotone Ammoniumchlorid-Lösung zersetzt. Durchflusszytometrische Proben wurden hierzu in 2 ml 1x RBC LysisBuffer für 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (400 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Probe anschließend mit PBS/BSA gewaschen. Daraufhin folgte die Antikörperfärbung wie unter 2.2.2.1. beschrieben.

#### 2.2.1.4. Präparation von Splenozyten und Knochenmark

Splenozyten wurden durch stumpfe Extrusion einer ganzen Milz mit 20G-Kanülen in eine PBS/BSA-Lösung gewonnen. Zur Isolation von Zellen des Knochenmarks wurden zuvor entnommene Knochen mit einer 23G-Kanüle punktiert und mit PBS/BSA gespült. Um größere Gewebereste und Knochensplinter zu entfernen, wurde die entstandene Zellsuspension hiernach durch einen 40 µm-Filter gegeben und für 5 Minuten mit 400 g bei RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, erfolgte die Erythrozyten-Lyse (s.2.2.1.3) mit 5 ml 1xRBC-LysisBuffer. Die Lyse für Splenozyten- und Knochenmarksuspensionen wurde für 5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach Zentrifugieren und einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 5 ml PBS/BSA aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.1.5.).

#### 2.2.1.5. Automatische Hämazytometrie

Proben aus Blut, Milz oder Knochenmark wurden mit einem automatischen Hämazytometer hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung analysiert. Für die Erstellung eines großen Blutbildes wurden 40 µl Suspension benötigt. Kontrollen zur Überprüfung der Zytometerleistung (MULTI-TROL) wurden täglich durchgeführt.

#### 2.2.1.6. Plasmagewinnung

Blutproben wurden wie in 2.2.1.2. beschrieben gewonnen und anschließend für 20 Minuten mit 3500 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und bei -80 °C bis zur ELISA-Analyse gelagert. Alle genutzten Proben wurden nur einmal aufgetaut.

#### 2.2.1.7. Knochenmark-Transplantation

Knochenmark-Spender waren zum Interventions-Zeitpunkt zwischen 12 und 20 Wochen alt. Spendern wurden 6 Knochen – jeweils beide Tibiae, Femora und Hemipelves – entnommen und das Knochenmark gründlich mit PBS/BSA herausgespült. Es wurde jeweils Knochenmark von 2-3 Spendern vereinigt, um die Spendervariabilität zu minimieren. Alle Empfänger waren zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen 8 und 10 Wochen alt. Diese wurden vor der Transplantation mit einer Dosis von 10,5 Gy einer Caesium-Quelle behandelt und erhielten  $2 \times 10^6$  NOD oder  $10 \times 10^6$  NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Knochenmarkzellen. Das Transplantat wurde innerhalb einer Stunde nach Bestrahlung der Empfänger in einem Volumen von 200  $\mu$ l in die laterale Schwanzvene injiziert. Die ersten vier Wochen nach Transplantation wurden die Empfänger zur Infektionsprophylaxe mit Baytril (0,02%, Trinkwasser) behandelt. Nach der vierwöchigen Behandlung erfolgten die wöchentlichen Kontrollen des Blutzuckerspiegels.

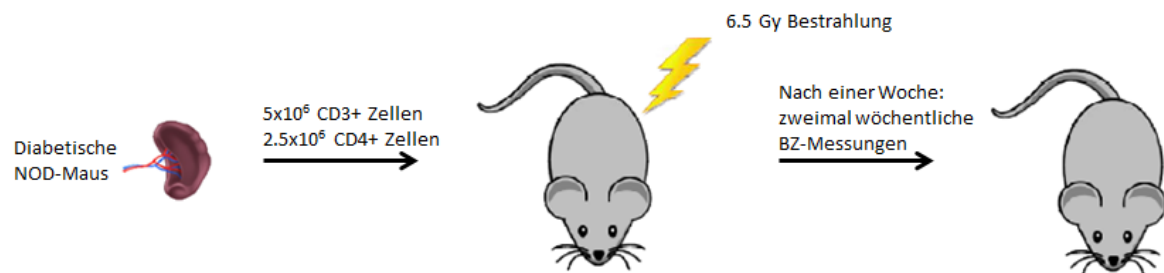


**Abbildung 4 Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Transplantationsregimes.**

#### 2.2.1.8. Adoptiver T-Zell Transfer

3-5 weibliche Spender diabetogener T-Zellen wurden nach Diabetes-Diagnose zur Entnahme der Milz schmerzlos getötet. Die Milz wurde entnommen, die

Splenozyten wurden wie beschrieben (s. 2.2.1.4) stumpf aus der Milzkapsel extruiert und in PBS/BSA gewaschen. Anschließend wurden Erythrozyten mit Ammoniumchlorid lysiert und hiernach eine immunomagnetische CD3-Negativselektion mit dem Pan T Cell Kit II nach Herstellerprotokoll durchgeführt.  $5 \times 10^6$  der so angereicherten CD3+ Zellen wurden den zuvor an einer Caesium-Quelle mit 6,5 Gy subletal bestrahlten Empfängern am selben Tag in die Schwanzvene injiziert. Im Falle des Transfers von angereicherten CD4+ oder CD8+ Zellen erfolgte eine Positivselektion mit dem CD4+T Cell Isolation Kit oder CD8+ T Cell Isolation Kit nach Herstellerangaben. In diesen Transfers wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen der angereicherten T-Zellen am selben Tag in die Schwanzvene der subletal konditionierten Empfänger injiziert. Nach einer Woche wurden die Empfänger zweimal wöchentlich hinsichtlich ihres Blutzuckers untersucht. Alle NOD und NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger-Mäuse waren zum Zeitpunkt des Transfers 8-10 Wochen alt und ausschließlich weiblich.



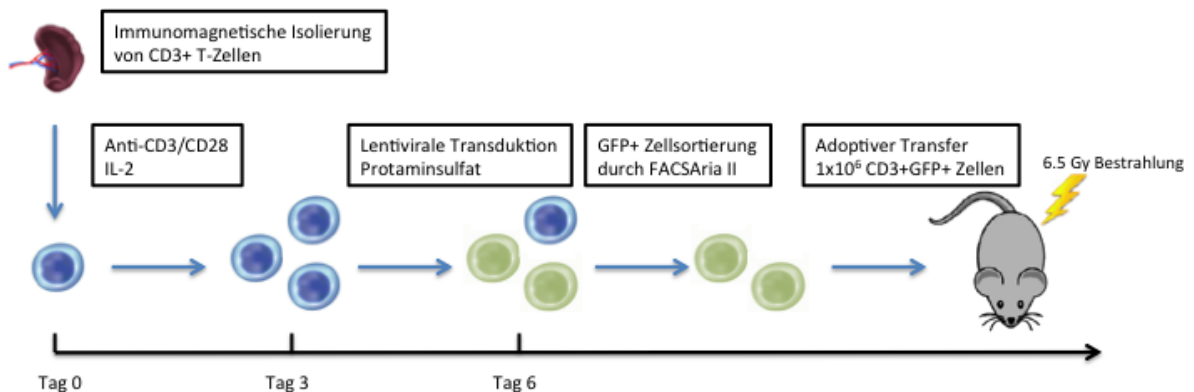
**Abbildung 5 Schema des in dieser Arbeit verwendeten adoptiven T-Zell-Transfers**

#### 2.2.1.9. Ex vivo Imaging nach adoptivem Transfer von transduzierten CD3+ Zellen

In einem weiteren adoptiven Transfer wurden T-Zellen von diabetischen Spendern mit einem bicistronischen Luciferase/GFP-Vektor transduziert (s. 2.2.4.9.), in der Absicht, ihre Infiltration in lymphatische und anderer Zielorgane *ex vivo* durch Biolumineszenz-Imaging darstellen zu können. Hierzu wurden nach Transduktion die GFP+-Zellen am FACS Aria II sortiert und daraufhin  $1 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l 0,9% NaCl-Lösung in die Schwanzvene jedes Empfängers injiziert.

Zum Zeitpunkt der ersten Diabetes-Diagnose erfolgte die schmerzlose Tötung der erkrankten NOD-Empfängermaus als auch zur Kontrolle einer NOD. $\alpha 4^{-/-}$

Empfängermaus zur Lokalisierung der transduzierten T-Zellen in beiden Mäusen. Zu behandelnde Mäuse erhielten eine Injektion von Luciferin (1,5 mg in 100 µl PBS) ins subkutane Fettgewebe. Nach zehn Minuten erfolgte eine zweite Injektion. Nach weiteren drei Minuten wurden die behandelten Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Zu untersuchende Organe wurden zügig entnommen und in PBS auf Eis und dunkel gelagert. 40 Minuten nach erster Injektion erfolgte die Biolumineszenz-Aufnahme durch IVIS Lumina II mit einer Exposure Time von 240 s und einer Object Height von 0,5 cm und die anschließende Analyse mit der Living Image Software 4.5.4. bei einem Binning von 4 und einem FOV (field of view) von 7,5.<sup>65</sup>



**Abbildung 6 Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Transduktionsregimes**

#### 2.2.1.10. Präparation Pankreas-infiltrierender Lymphozyten

Zum fachgerechten Verdau des Pankreas zur Gewinnung von Langerhans-Inseln wird eine optimale Zufuhr von Kollagenase IV in das Organ benötigt. Diese wird unmittelbar postmortal durch Punktion der Gallenblase mit vorheriger Abklemmung proximal und distal der Papilla major und anschließender Injektion von 1 ml HBBS++ erreicht. Die Pankreata wurden anschließend entnommen und in 50 ml-Falcons mit 5 ml HBBS++ aufbewahrt.<sup>66;67</sup>

Zur Aufreinigung der Langerhans-Inseln wurden die Pankreata für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und zwei- bis dreimal geschüttelt. Anschließend wurden die Pankreata bis zur Herstellung einer homogenen Suspension geschüttelt. Hiernach folgte die Zugabe von 20 ml HBBS und die

Lagerung auf Trockeneis, um den Kollagenase-vermittelten Verdau zu stoppen. Eine einminütige Zentrifugation mit 300 g bei 4 °C ermöglichte das Dekantieren des Überstands. Dieser Waschschrift erfolgte ein weiteres Mal, bevor die möglichst gründlich homogenisierte Suspension durch einen 70 µm-Filter gegeben wurde. Die gefilterte Suspension wurde in eine Petri-Schale gegeben und die unter dem Mikroskop sichtbaren Langerhans-Inseln mit einer Pipette einzeln in ein RPMI++ Medium überführt. In diesem Medium wurden die Langerhans-Inseln über Nacht in einem 5% CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37 °C aufbewahrt, um die Emigration der Leukozyten in das Medium zu ermöglichen. Am nächsten Tag erfolgte die Antikörper-Färbung und durchflusszytometrische Analyse wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben.

#### 2.2.1.11. Prüfung der humoralen Immunkompetenz von NOD und NOD.α4-/- Mäusen

Zur Untersuchung der humoralen Funktionalität der B-Zellen in unserem Mausmodell wurde eine Immunisierungsstudie mit dem zugelassenen Hepatitis B Impfstoff HBVaxPro durchgeführt. Die Injektion von HBVaxPro erfolgte nach Isofluran-Narkose der zu behandelnden Mäuse mit einem Gesamtvolumen von 100 µl Impfstoff. Dies entspricht 10% einer Erwachsenenendosis. Hierzu wurden jeweils 50 µl des Impfstoffs intramuskulär in beide *Mm. Quadriceps* injiziert. Zur Immunisierung erhielten zu behandelnde Mäuse ab der achten Lebenswoche drei wöchentliche Injektionen und eine weitere drei Monate nach der letzten Injektion, um die Bildung von B-Gedächtniszellen zu untersuchen. Die Blutentnahmen zur Plasma-Gewinnung erfolgten jeweils eine Woche nach der letzten Injektion als auch eine Woche vor der Impfauffrischung. Anti-HBs-AK-Titer wurden durch den ARCHITECT i1000SR bestimmt.

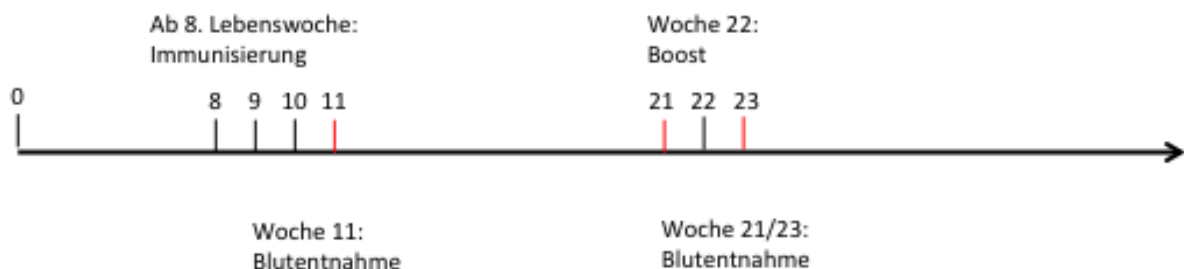


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Hepatitis-B Immunisierungsstudie

#### 2.2.1.12. Mikrobiota-Analysen

Systematische Analysen haben gezeigt, dass die Mikrobiota von Mäusen im Wesentlichen eine umgebungsspezifische Flora widerspiegeln, die relativ unabhängig vom Mausstamm ist. Andererseits wird eine (reziproke) Beziehung zwischen Diabetes und Mikrobiota beschrieben.<sup>68;69</sup> Zur Überprüfung des Einflusses einer diabetischen Stoffwechsellage auf die Mikrobiota des Darms, bzw. zur Beantwortung der Frage, in wie weit bei kohabitierenden diabetes-resistenten NOD. $\alpha$ 4-/- Mäusen und diabetischen NOD Mäusen die Mikrobiota gegenüber dem Ausgangszustand verändert wird, wurden Stuhlproben nicht-diabetischer, prä-diabetischer und diabetischer Mäuse, sowie von ihren Diabetes-resistenten Wurfgeschwistern gesammelt.

Zu Beginn wurden hierzu Mäuse in Käfige mit frischem Streu umgesetzt und das Gewicht des Futters und der jeweiligen Maus festgehalten. Nach 48 Stunden erfolgte eine weitere Messung des Gewichts von Futter und Maus und die Sammlung der Stuhl-Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Diese wurden anschließend bis zum Versand an das MMPC (Mouse Metabolic Phenotyping Center, University of California, Davis) bei -80 °C gelagert.

Unsere Kooperationspartner aus dem MMPC extrahierten die DNA aus den Stuhlproben mit dem Mo-Bio PowerFecal Kit (Qiagen). Die aufgereinigte DNA wurde mit den F319 und R806 Primern in der V4 Region der 16S rRNA-Gen durch eine PCR amplifiziert. Die High-throughput-Sequenzierung wurde mit Illumina MiSeq durchgeführt. Die Analyse der hierdurch generierten Daten wurde mittels QIIME2 und DADA2 prozessiert.<sup>70</sup> OTUs/features (Quality filtering and feature) für die 319F-806R-Region wurden taxonomisch klassifiziert.<sup>71</sup> Schließlich wurden Diversitäts-Analysen der resultierenden OTU/feature durchgeführt, um phylogenetische als auch nicht-phylogenetische Aussagen zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität des Mikrobioms zu treffen.<sup>72</sup>

#### 2.2.2. Durchflusszytometrie

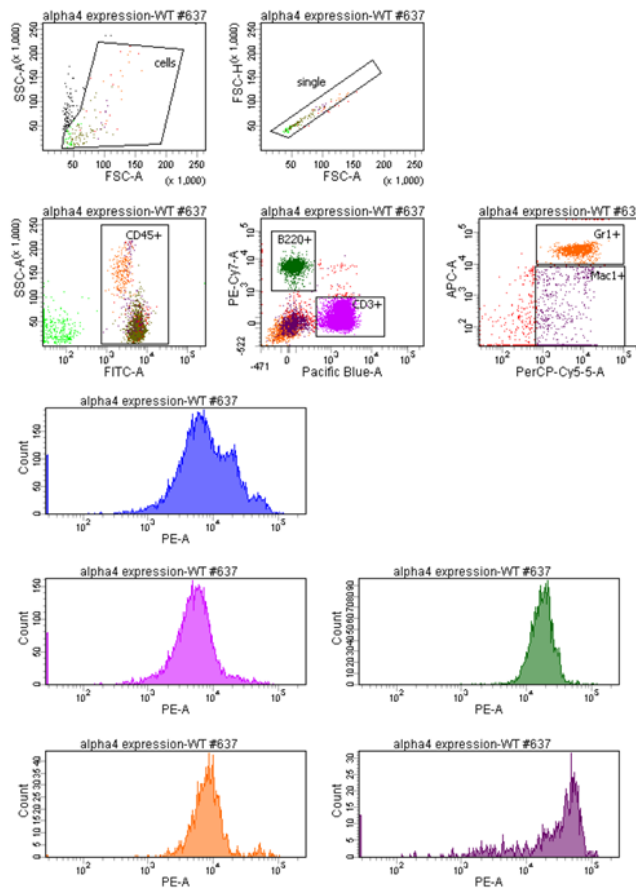
Für durchflusszytometrische Analysen wurden zwischen 30  $\mu$ l und 50  $\mu$ l Peripherblut bzw. zwischen  $0,5 \times 10^6$  und  $2 \times 10^6$  Knochenmark – oder Milzzellen



eingesetzt. Zur Färbung wurden den Herstellerangaben entsprechend optimale Antikörperkonzentrationen eingesetzt. Die Proben wurden mit entsprechenden Antikörperkombinationen für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. In Peripherblutproben wurden die Erythrozyten lysiert (s. 2.2.1.3) und die Proben einmal mit PBS/BSA gewaschen. Die Vermessung der Proben erfolgt am LSR Fortessa II. Direkt vor der Messung wurden Knochenmarks- und Milzproben durch einen 35 µm Filter filtriert. Das Durchflusszytometer wird hierzu mit ungefärbten Proben und FMO-Kontrollen eingestellt. Zur Kompensation werden Einzelfärbungen verwendet. Die Analyse wurde mit der FACSDiva Software durchgeführt.

#### 2.2.2.1. Oberflächenanalyse

Abbildung 8 zeigt eine typische Messung der  $\alpha 4$ -Expression von PBMCs einer NOD Maus. Hierzu wurde Peripherblut lysiert und mit PBS/BSA gewaschen. Darauf folgte die Antikörperfärbung mit jeweils 1 µl CD45, CD3, B220, CD11b, Gr1 und CD49d für 20 Minuten bei 4 °C. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 300 µl PBS/BSA aufgenommen und analysiert. Weitere Oberflächenfärbungen erfolgten nach demselben Verfahren.



Tube: WT #637

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	22,269	###	100.0
cells	13,466	60.5	60.5
single	12,883	95.7	57.9
CD45+	10,374	80.5	46.6
CD3+	5,990	57.7	26.9
B220+	2,196	21.2	9.9
CD3+ OR B220+	8,186	78.9	36.8
NOT(CD3+ OR B220+)	2,188	21.1	9.8
Gr1+	1,077	49.2	4.8
Mac1+	733	33.5	3.3

Experiment Name: 20171116-knockout control  
 Specimen Name: alpha4 expression  
 Tube Name: WT #637  
 Record Date: Nov 16, 2017 4:32:25 PM  
 Operator: Salim  
 GUID: 391e7e88-57c0-4c3d-bac4-506...

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean	PE-A Median
All Events	22,269	###	7,355	2,503
cells	13,466	60.5	10,418	5,719
single	12,883	95.7	9,525	5,564
CD45+	10,374	80.5	11,801	7,066
CD3+	5,990	57.7	6,660	4,977
B220+	2,196	21.2	18,136	16,959
CD3+ OR B220+	8,186	78.9	9,739	6,460
NOT(CD3+ OR B220+)	2,188	21.1	18,567	9,677
Gr1+	1,077	49.2	10,201	7,882
Mac1+	733	33.5	33,901	35,529

**Abbildung 8** Repräsentatives Beispiel für die  $\alpha 4$ -Expression auf PBMCs der wildtypischen NOD Maus. Nach einem morphologischen Gate und Doubletten-Ausschluss wurde auf CD45<sup>+</sup>-Zellen und hiervon auf CD3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> und Gr1 getaget. Die  $\alpha 4$ -Expression der jeweiligen Zellpopulationen ist im PE-Kanal zu sehen.

### 2.2.2.2. Intrazelluläre Färbung (IFN $\gamma$ )

Der Färbung von intrazellulärem IFN $\gamma$  ging die zuvor beschriebene Oberflächenfärbung voraus. In diesem Falle wurde die Oberflächenfärbung jedoch 30 Minuten lang durchgeführt. Nach dem anschließenden Waschen mit PBS/BSA und Zentrifugieren wurden die Zellen für 30 Minuten mit 1 ml Fix/Perm Solution (4 °C, im Dunkeln) inkubiert. Alle darauffolgenden Waschschrte wurden mit 1 ml 1xPerm Solution durchgeführt. Nach Waschen mit 1xPerm-Solution erfolgte die intrazelluläre Färbung mit 1  $\mu$ l IFN $\gamma$ -Antikörper für weitere 40 Minuten (4 °C, im Dunkeln). Die Zellen wurden schließlich ein letztes Mal gewaschen und daraufhin analysiert.

### 2.2.2.3. Dextramer/Tetramerfärbung

Zur Färbung von IGRP-spezifischen CD8+-Zellen wurden Peripherblut und Splenozyten genutzt. Diese wurden nach Herstellerangaben zuerst mit dem MHCI-Dextramer (10 Minuten, 4 °C, im Dunkeln) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Oberflächenfärbung wie zuvor beschrieben (s.2.2.2.1).

Zur Darstellung Insulin-spezifischer CD4+-Zellen wurden Peripherblut und Splenozyten genutzt. Diese wurden initial mit I-A(g7) MHC Class II Tetramer (20 µg/ml) als auch einem unkonjugierten T-Zell-Rezeptor Cβ-spezifischen Antikörper (1 µg/ml) im Brutschrank (2h, 37 °C, im Dunkeln) inkubiert. Letzteres ist als Adjuvant in Tetramer-Färbungsprotokollen etabliert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.<sup>73</sup> Nach einem Waschschrift mit PBS/BSA erfolgte eine Oberflächenfärbung wie zuvor beschrieben.

### 2.2.3. Biochemische Methoden

#### 2.2.3.1. IAA-Sandwich-ELISA

Ein Sandwich-ELISA ist eine robuste und etablierte Methode zur Detektion und Quantifizierung von Antikörpern. Hierzu erfolgte eine Immobilisierung des Antigens auf einer 96-Well-Platte und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Im Falle des IAA-ELISA wurde dieser Schritt bereits durch den Hersteller durchgeführt. Anschließend werden sowohl die Proben als auch eine Verdünnungsreihe von aufgereinigten Antikörpern zur Erstellung einer Standardkurve dazugegeben. Ungebundene Antikörper werden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Durch die Zugabe eines spezifischen biotinylierten Sekundärantikörpers wird das Sandwich komplettiert. Daraufhin wird eine Avidin-Horseradish Peroxidase hinzugegeben und freie Komponenten durch wiederholtes Waschen entfernt. Nach Zugabe des Substrats kommt es zur HRP-vermittelten Chemilumineszenz-Reaktion. Durch Zugabe einer Stop Solution wird die Reaktion beendet. Die OD (optical density) kann nun spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Die Messung erfolgte durch VICTORX4. Der OD-Wert ist proportional zu der Konzentration der Mouse IAA. Durch die mitgeführte Standardreihe kann somit die Konzentration der Proben errechnet werden.

#### 2.2.3.2. HBs-ELISA

Zur Untersuchung der humoralen Antwort der Mäuse wurde der auch bei Menschen verwendete Impfstoff HBVAXPRO zur Immunisierung gegen das HBV Kapsidprotein HBs genutzt. Zur Messung von Anti-HBs-Titern wurden Plasmaproben der jeweiligen Mäuse 1:3 mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Initial wurde das entsprechende Programm zur Messung der HBs-Antikörper gewählt. Ein Minimum von 120 µl wurde daraufhin in entsprechende Reaktionsgefäße des ARCHITECT i1000SR pipettiert.

#### 2.2.3.3. Zytokin-Assay

Zur Untersuchung der Sensibilisierung von T-Zellen gegenüber Inselzellantigenen der NOD und NOD.α4-/- Maus wurde die Reaktion von Splenozyten beider Mäuse auf ein für den T1D relevantes Inselzell-Autoantigen namens IGRP getestet.<sup>74</sup> Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  frisch entnommene Splenozyten von gleichaltrigen männlichen Mäusen in 1 ml RPMI Medium ohne Zusätze in einer 28-Well-Platte kultiviert und mit IGRP (9,1 µM) stimuliert. Zur Positivkontrolle wurden PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (750 ng/ml) hinzugegeben, während die Negativkontrolle unbehandelt blieb.

2 Stunden nach Zugabe des Antigens oder PMA+Ionomycin wurde 1 µl GolgiStop in alle wells gegeben. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen mit 2 ml PBS/BSA gewaschen. Es folgte eine Oberflächenfärbung mit anschließender Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Letztlich wurde eine intrazelluläre Färbung von IFN $\gamma$  durchgeführt. Nach anschließendem Waschen wurden die Zellen analysiert.

#### 2.2.3.4. Immunomagnetische Zellanreicherung

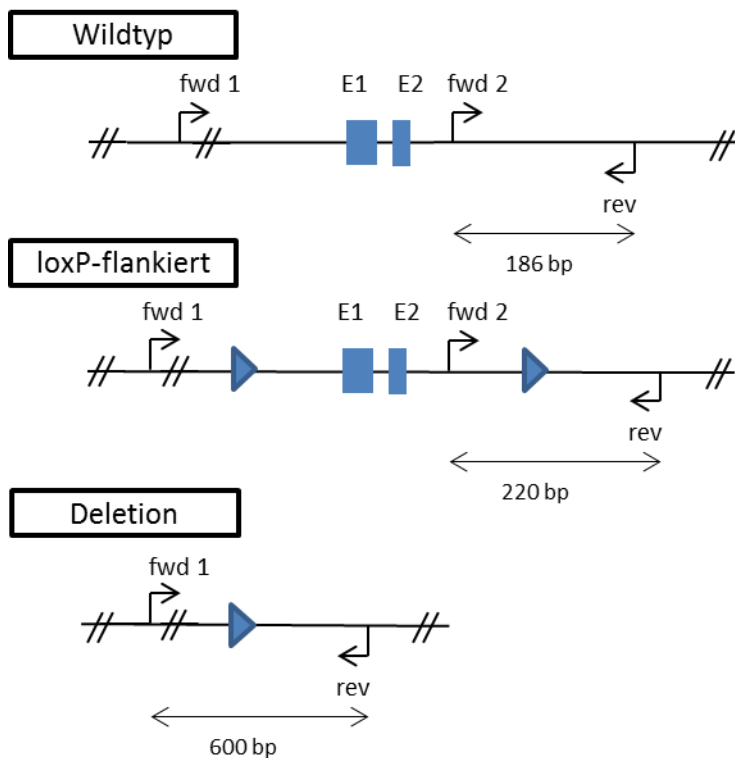
Zur Anreicherung bestimmter T-Zellpopulationen wurden immunomagnetische *beads* genutzt. Dabei sind superparamagnetische Partikel kovalent an spezifische Antikörper gebunden. Im Falle der CD3+ Negativselektion markieren diese Antikörper CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC-class II und Ter-119. Dies ermöglicht eine Anreicherung von T-Zellen, ohne dabei den T-Zell-Rezeptor zu binden und

diesen hierdurch zu stimulieren. Im Falle der CD4+ oder CD8+ Positivselektion ist dies nicht notwendig, da eine Bindung an CD4 oder CD8 keine Auswirkungen hat. Die Kits wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Anreicherung erfolgt automatisch durch den AutoMACS pro Separator.

## 2.2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1. PCR

Zur Identifizierung der Mäuse mit Cre-Rekombinase-vermittelter  $\alpha 4$ -Ablation wurde sowohl die Cre-Region als auch die wildtypische, gefloخته oder deletierte Region des  $\alpha 4$ -Gens durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert.<sup>53</sup>



**Abbildung 9 Konstruktion der loxP-flankierten  $\alpha 4$ -Allele und Genotypisierungsstrategie.** Es handelt sich um eine Drei-Primer-Strategie mit den Primern Forward 1, Forward 2 und Reverse, welche das Wildtyp-Allel als 186bp-Bande, das loxP-flankierte Allel als 220bp-Bande und das Wildtyp-Allel als 600bp-Bande identifiziert. (Scott *et al.* 2003)

Hierfür wurden Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Mäuse über Nacht bei 56 °C in 200  $\mu$ l DirectPCR lysis Reagent (Viagen) mit darin enthaltenen 2  $\mu$ l Proteinase K verdaut. Am nächsten Morgen wurde die Probe dann für 45

Minuten auf 85 °C erhitzt, um die Proteinase zu inaktivieren, bevor die Proben bei -20 °C gelagert oder sofort für eine PCR-Analyse verwendet wurden. Für die PCR wurden 0,5 µl der jeweiligen Probe zusammen mit 19,5 µl eines Mastermixes, der alle Komponenten zur Amplifikation des zu untersuchenden Gens beinhaltet, genutzt. Die in der Tabelle beschriebenen Volumina wurden so gewählt, dass eine vom Hersteller empfohlene finale Primer-Konzentration von jeweils 0,4 µM vorlag.

**Tabelle 6. Reaktionsansatz und PCR-Programm zur Genotypisierung**

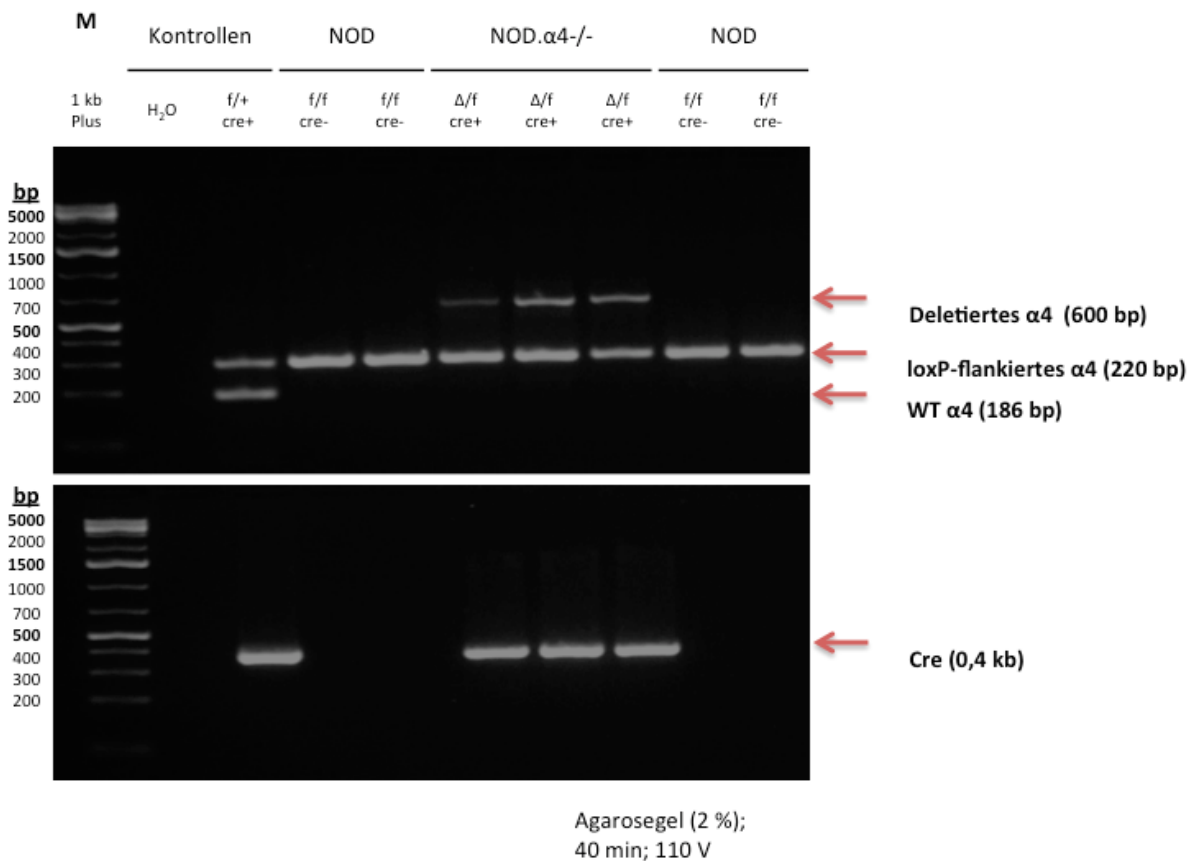
Inhalte des Mastermix	Volumen pro Probe in µl	PCR Zyklus
Forward Primer 1 (a4g1986)	0,5	95°C 2 min 95°C 30 s 60°C 30 s 72°C 60 s 72°C 10 min 40x
Forward Primer 2 (a4g2011)	0,5	
Reverse Primer (a4g2191)	10	
Red Extract	8	
dd H <sub>2</sub> O		

Inhalte des Mastermix	Volumen pro Probe in µl	PCR Zyklus
Forward Primer (Cre1)	0,5	95°C 2 min 95°C 30 s 60°C 30 s 72°C 60 s 72°C 10 min 40x
Reverse Primer (Cre2)	0,5	
Red Extract	10	
dd H <sub>2</sub> O	8,5	

**Tabelle 7. Eingesetzte Oligonukleotidpaare in der Genotypisierungs-PCR**

Primer	Sequenz von 5'-3'
Forward 1 (a4g1986)	-CCA CCT GGT GTA TGA AAG C-
Forward 2 (a4g2011)	-CGG GAT CAG AAA GAA TCC A-
Reverse (a4g2191)	-CTG GCA TGG GGT TAA AAT TG-
Forward (Cre1)	-ACC TGA AGA TGT TCG CGA TTA-
Reverse (Cre2)	-ACC GTC AGT ACG TGA GAT ATC

Nach der Amplifikation der Zielgene wurden die Proben auf ein 2%iges Agarose-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 110V für 40 Minuten durchgeführt. Schließlich folgte die Visualisierung der DNA-Fragmente durch die Anfärbung mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht.



**Abbildung 10 α4- und Cre-Genotypisierung.** Aufgetragen sind Marker (M), H<sub>2</sub>O-Kontrolle, eine Positivkontrolle mit wildtypischen und loxP-flankierten Allel (f/+), in der gleichen Spalte eine cre-positive Probe als Kontrolle und in den übrigen Geltaschen (4-10) ein repräsentativer Wurf (7) aus einer gemischten Verpaarung. Es zeigen sich vier loxP-flankierte (f/f) und cre-negative (cre-) Proben und drei loxP-flankierte und teilweise deletierte α4-Allele (Δ/f) sowie cre-positive (cre+) Proben.

#### 2.2.4.2. Kultivierung von *E. coli*

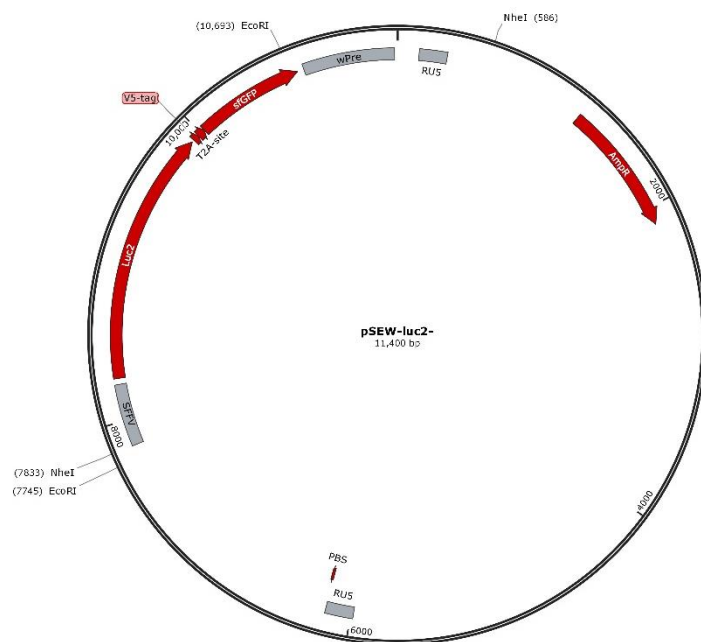
Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in lysogeny broth (LB) -Medium. Für die Selektion über eine Ampicillin-Resistenz wurde das Medium mit dem Antibiotikum in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Das Ampicillin

wurde jeweils vor dem Gebrauch frisch hinzugefügt. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurden vor dem Autoklavieren 35 g LB-Agar zu einem Liter LB-Medium hinzugefügt, sodass sich eine Endkonzentration von 3,5 % (w/v) ergab. Die LB- Platten wurden bis zu ihrer Nutzung bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.2.4.3. Transformation von *E. coli*

Die Transformation diente der Vervielfältigung des pSEW-lucs2 Plasmids, das freundlicherweise von Prof. Buchholz zu Verfügung gestellt wurde.<sup>75</sup> Ein 50 µl Aliquot hitzekompetenter *E. coli*-Bakterien (NEB Turbo Competent *E. coli*, New England BioLab), welches zuvor bei -80 °C gelagert wurde, wurde hierzu auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 ng des pSEW-luc2 Plasmids hinzugegeben und das Gemisch für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein 30-sekündiger Hitzeschock zur Einbringung des Plasmids in die Bakterien in einem zuvor auf 42 °C erwärmten Heizblock. Nach einer fünfminütigen Abkühlung der Bakterien auf Eis wurde die *E. coli*-Suspension mit 950 µl SOC-Medium vermischt und für 60 Minuten im Schüttler (250 rpm, 37°C) inkubiert. Schließlich wurden die Bakterien auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit Selektionsmarker (Ampicillin) verteilt und über Nacht bei 37 °C im Inkubator gehalten. Am nächsten Tag (nach ca. 16h) wurden Klone mit sterilen Pipettenspitzen von der Agar-Platte in jeweils 5 ml LB-Amp-Medium überführt und für 12-16 Stunden (250 rpm, 37 °C) im Schüttler inkubiert.





**Abbildung 11 Plasmid-Karte des pSEW-luc2-Vektors mit Darstellung der Schnittstellen für Restriktionsenzyme.** Plasmid und Plasmidkarte wurden freundlicherweise von Prof. Christian Buchholz (Paul Ehrlich Institut, Langen) zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.4.4. Testrestriktion

Zur Überprüfung der produzierten Plasmid-DNA wurde anhand der Plasmidkarte (s. Abbildung 11) ein Testverdau mit den Enzymen BamHI und NotI angesetzt. Hierzu wurde FD Green Buffer zusammen mit FastDigest BamHI und FastDigest NotI (alle von ThermoFisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) entsprechend Tabelle 8 mit destill. Wasser resuspendiert. Der angesetzte Verdau wurde hiernach für 15 Minuten durch den Heizblock auf 37 °C erwärmt. Schließlich wurden die Proben auf ein 1%iges Agarose-Gel geladen und bei 110 V für 40 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 8. Reaktionsansatz zum Testverdau**

Reagenzien	Volumen (µl)
Plasmid-DNA (500µg/ml)	1
FastDigest BamHI	1
FastDigest NotI	1
10x FD Green Buffer	2

#### 2.2.4.5. DNA-Isolation

Die Plasmid-DNA aus den *E. coli* Zellen wurde mit dem XChange Plasmid Maxi Kit (PeqLab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Anzucht der Kultur erfolgte hierfür in 150 ml LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm über Nacht. Nach der Isolation wurden die Konzentration und die Reinheit der DNA am Nanodrop Spektralphotometer bestimmt. Die isolierten Plasmide wurden bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.2.4.6. Kultivierung von HEK293T Zellen

HEK293T Zellen wurden von Takara Bio (USA) erworben. Es wurden Cellstar T175 Kulturflaschen der Firma Greiner Bio-One GmbH, welche geeignet für die Kultivierung adhärenter Zellen sind, genutzt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in DMEM++ Medium kultiviert und alle 2 Tage gesplittet. Dichte und Morphologie waren ausschlaggebend für die Wahl der genutzten Kulturflasche und Zeitpunkte des Splittings. Hierfür wurden die Zellen durch einmaliges Waschen mit 20 ml PBS und anschließendem Verdau mit 3 ml 1xTrypsin für 5 Minuten im Brutschrank abgelöst. Hiernach wurde der trypsinvermittelte Verdau mit 10 ml DMEM++ gestoppt und die Zellzahl mittels Neubauerkammer ermittelt. Abschließend wurden die Zellen bei einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  in einer T175-Zellkulturflasche ausgesät.

#### 2.2.4.7. Transfektion

An Tag 0 der Transfektion wurden  $14 \times 10^6$  HEK293T Zellen in 20 ml DMEM++ in einer T175-Zellkulturflasche ausgesät. An Tag 1 erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM++ und etwa 4 Stunden danach die Transfektion. Hierbei war die Dichte und Morphologie entscheidend für den Zeitpunkt. Zur Transfektion wurden zwei OPTI-MEM-Lösungen nach dem in Tabelle 9 dargestellten Schema angesetzt und für 20 Minuten bei RT inkubiert.

**Tabelle 9. Ansatz der OPTI-MEM-Lösungen zur Transfektion**

Lösung A		Lösung B	
OPTI-MEM	2437,9 µl	OPTI-MEM	2359,65 µl
pSEW-luc2 (1 µg/µl)	18 µl	L-PEI (1 µg/µl)	140,35 µl
pMD2.VSV-G (1ug/µl)	7,7 µl	total	2500 µl
M334 (1ug/µl)	14,4 µl		
total	2500 µl		

Die Zugabe des Transfektions-Gemischs erfolgte möglichst gleichmäßig auf der Mediumoberfläche, um eine gute Verteilung der Plasmide zu gewährleisten. 12 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Austausch des Mediums. Diesmal wurden 15 ml DMEM++ hinzugegeben. 24 Stunden nach diesem Mediumwechsel erfolgte die Virusernte.

#### 2.2.4.8. Aufkonzentrierung der Viruspartikel

24 Stunden nach der Transfektion wurde das Zellmedium in 50 ml Falcons überführt und anschließend für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in sterile Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Anschließend wurde der Virus-haltige Überstand mit 5 ml 20%iger Saccharose-Lösung unterschichtet, sodass eine klare Phasentrennung sichtbar wurde. Nach finalem Austarieren unter sterilen Bedingungen mit DMEM++ Medium, wurden die Röhrchen für 2 Stunden (20000 g und 4° C) zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand verworfen und die Röhrchen für 10 Minuten getrocknet. Das Virus-Pellet wurde daraufhin in 200 µl RPMI+++ pro Zentrifugenröhrchen, möglichst ohne die Bildung von Luftblasen, resuspendiert und aus allen Röhrchen zusammengeführt und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### 2.2.4.9. Transduktion

Mit dem Pan T Cell Kit aufgereinigte NOD-T-Zellen wurden in einer Konzentration von  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI++ Medium mit 30 IU/ml mL-2 kultiviert. Am Tag der Gewinnung der T-Zellen wurden zudem CD3/CD28

Dynabeads in einem Verhältnis von 1:1 nach Herstellerangaben für 3 Tage dazugegeben. An Tag 3 wurden diese magnetisch entfernt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Protaminsulfat in einer Endkonzentration von 4 µg/ml versetzt. Es wurden verschiedene Volumina des produzierten Virus zur Titrierung dazugegeben. 24 Stunden nach Zugabe des Virus erfolgte ein Mediumwechsel mit RPMI++ und 30 IU/ml mL-2. 48 Stunden später erfolgte die FACS-Analyse wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

#### 2.2.5. Datenanalyse und Software

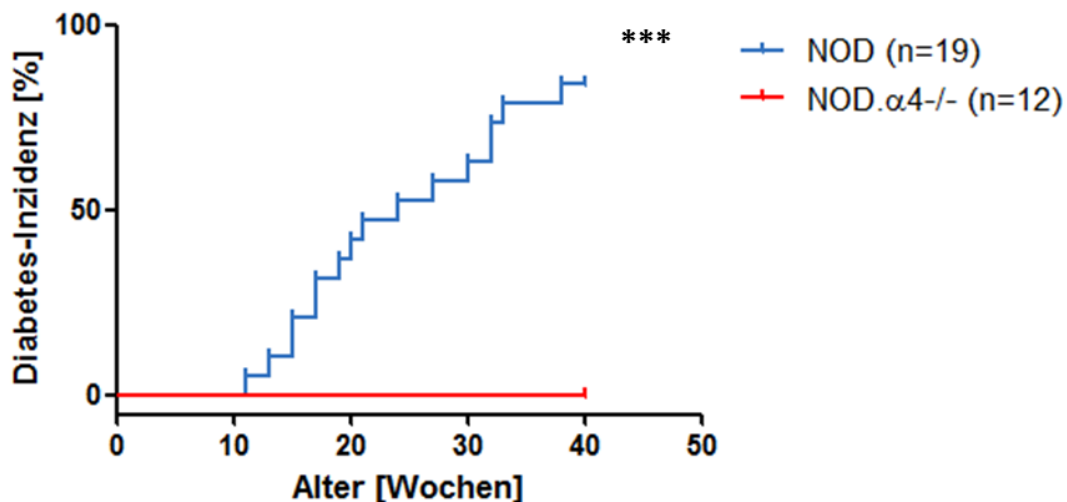
Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel verarbeitet und ausgewertet. Zur Berechnung statistischer Signifikanzen und zur Erstellung der Abbildungen wurde Graphpad Prism 5.0.1 (San Diego, CA, USA) verwendet. Zur Unterscheidung von zwei Wertepaaren wurde der Student t-Test genutzt. Inzidenzkurven wurden mit Hilfe des Log-rank (Mantel-Cox) Tests ausgewertet. Zur Erstellung von Schemata wurde Powerpoint und zum Layout der Arbeit wurde Word verwendet (Windows 10.0 mit Office 13.2; Microsoft, Redmont, WA, USA). Die Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit Reference Manager 12 (Clarivate, Philadelphia, PA, USA).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Primärprävention

Die NOD.α4<sup>-/-</sup> Maus wurde durch unabhängige Züchtung von jeweils α4<sup>f/f</sup> und Tek-cre Mäusen mit NOD Mäusen über 10 Generationen generiert. Die α4-Expression in α4<sup>-/-</sup> Leukozyten ist bis auf eine minimale Restaktivität ablatiert, wobei andere Genotypen (α4<sup>f/+</sup> oder α4<sup>+/+</sup>.cre<sup>+</sup>, als auch cre-negative Nachkommen, zusammenfassend als "NOD Mäuse" bezeichnet) qualitativ und quantitativ identisch im Hinblick auf ihre α4-Expression sind (nicht gezeigt). 12 NOD.α4<sup>-/-</sup> und 19 NOD Weibchen wurden über 40 Wochen durch wöchentliche Blutzucker-Messungen auf die Entwicklung von Typ 1 Diabetes untersucht. Während die 19 NOD Mäuse mit der erwarteten Frequenz Diabetes entwickelten (84% nach 40 Wochen bei typischer Kinetik), erkrankte keine der

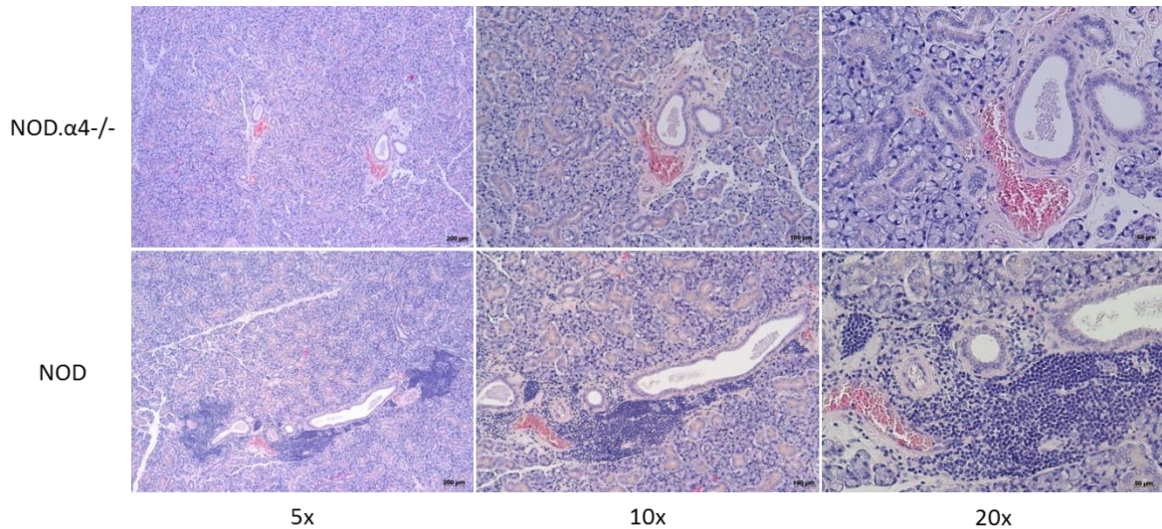
12 NOD. $\alpha$ 4<sup>-/-</sup> Mäuse innerhalb des Beobachtungszeitraums ( $p < 0,0001$ ). Diese Daten korrobrieren die Beobachtungen von Frau Dr.med. Sarah K. Wegner.



**Abbildung 12 T1D-Primärprävention.** Diabetes-Prävalenz  $\alpha$ 4-kompetenter weiblicher NOD Mäuse (n=19) und weiblicher NOD. $\alpha$ 4<sup>-/-</sup> Mäuse (n=12). 84% der NOD aber keines der NOD. $\alpha$ 4<sup>-/-</sup> Weibchen entwickelte eine diabetische Stoffwechsellaage innerhalb der ersten 40 Lebenswochen. ( $p < 0,0001$ )

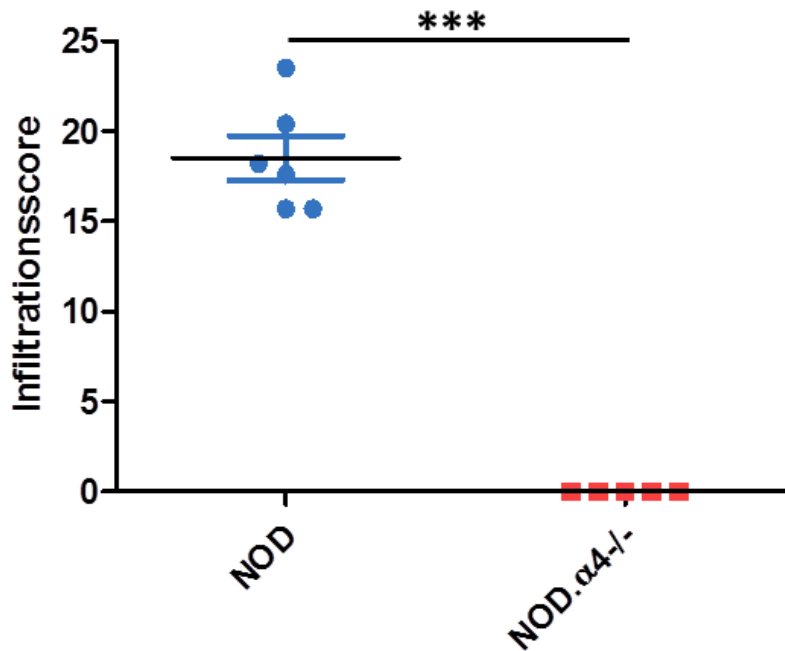
### 3.2. Sialitis-Histologie

Die NOD Maus zeigt mit altersabhängig zunehmender Prävalenz und Ausprägung lymphozytäre Infiltrationen in mehreren drüsigen Organen, unter anderem in Pankreas, Kolon und Speicheldrüsen.<sup>40</sup> Zur Untersuchung der Auswirkungen der embryonalen  $\alpha$ 4-Ablation in hämatopoetischen Zellen auf die bekannten Speicheldrüsen-Infiltrate der NOD Maus wurden die Gl. *submandibulares* von 20 Wochen alten NOD (n=5) und NOD. $\alpha$ 4<sup>-/-</sup> (n=6) Mäusen, einem Zeitpunkt, an dem gemäß der Literaturlage die zahlreichen Infiltrate histologisch schon nachweisbar und funktionelle Beeinträchtigungen im Sinne eines Sicca-Syndroms schon nachzuweisen sein sollten, histologisch untersucht.<sup>62</sup>



**Abbildung 13. Sialitis-Histologie.** Exemplarische Darstellung histologischer Schnitte mit HE-Färbung der *Gl. submandibularis* von je einer 20 Wochen alten NOD (untere Zeile) und NOD.α4<sup>-/-</sup> (oben) Maus in verschiedenen mikroskopischen Vergrößerungen (v.l.n.r. 5x,10x, 20x). Während die *Gl. submandibularis* der NOD-Maus charakteristische lymphozytäre Infiltrate und eine zum Teil vollständig zerstörte seröse Acinusstruktur unter Erhalt der Ductuli aufweist, ist die Drüse der NOD.α4<sup>-/-</sup> Mäuse frei von Infiltraten und histologisch gänzlich unauffällig.

Pro Maus wurden 10 nicht-serielle Schnitte der *Gl. submandibularis* hergestellt, angefärbt und histologisch analysiert. Nach Zählung der Infiltrate im serösen Drüsengewebe ergibt sich eine mittlere Summe von  $19 \pm 1$  Infiltraten pro histologischem Schnitt der *Gl. submandibularis* in den 6 untersuchten NOD Mäusen, während in keiner der 5 untersuchten NOD.α4<sup>-/-</sup> Mäuse ein Infiltrat vorhanden ist (s. Abb. 3,  $p < 0,0001$ ).

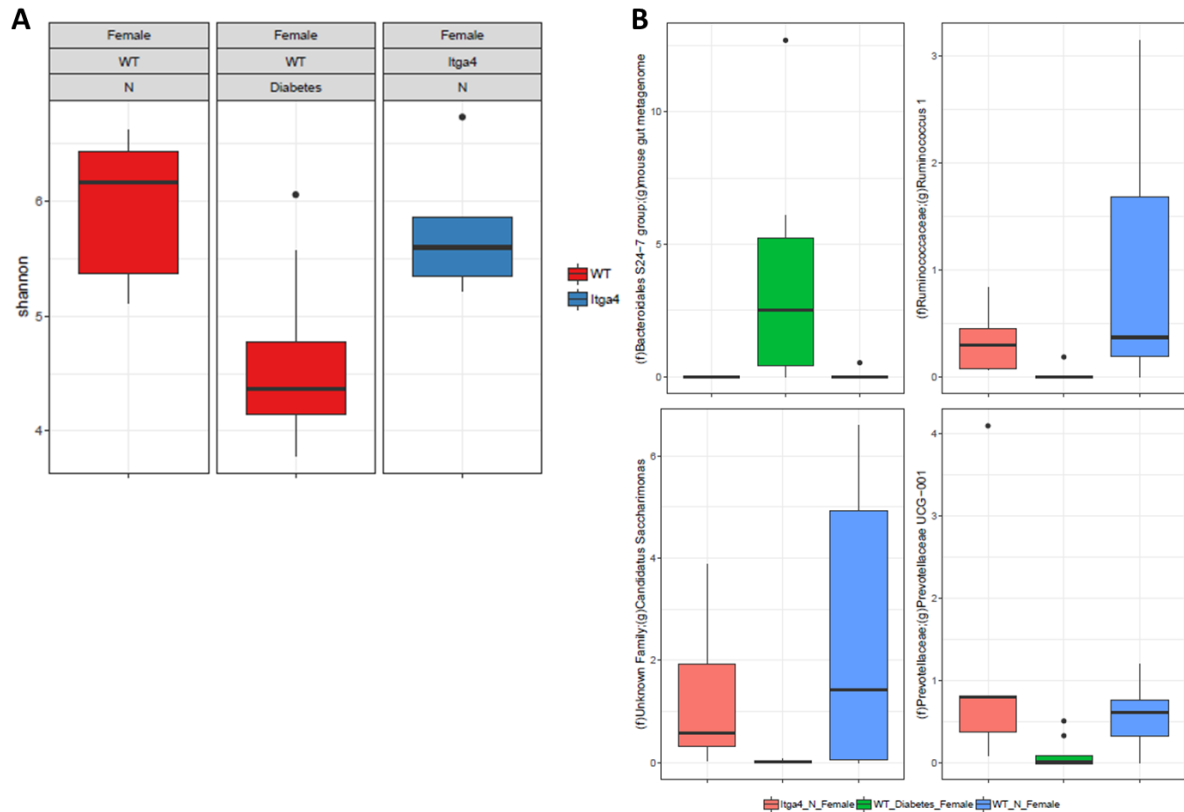


**Abbildung 14. Sialitis-Primärprävention.** Infiltrationsscore (Mittlere Anzahl an Leukozyteninfiltraten pro histologischem Schnitt. Für jede Gl. *submandibularis* wurden 10 nicht-serielle histologische Schnitte auf Leukozyteninfiltrate untersucht) in  $\alpha 4$ -kompetenten weiblichen NOD (n=6) und weiblichen NOD. $\alpha 4^{-/-}$  (n=5) Mäusen. Alle NOD aber keine der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse entwickelte eine Sialitis. Die Versuchstiere waren zum Untersuchungszeitpunkt 24 Wochen alt ( $p < 0,0001$ ).

### 3.3. Mikrobiom

Jüngst konnte gezeigt werden, dass an T1D erkrankte Kinder eine veränderte Darmflora besitzen, ohne jedoch einen kausalen Zusammenhang aufzeigen zu können.<sup>76</sup> Hier steht vor allem die Frage im Raum, ob ein verändertes Mikrobiom T1D auslöst und/oder ob die diabetische Stoffwechsellage und durch diese bedingte Veränderungen des Stuhls möglicherweise eine (De-)Selektion bestimmter Bakterien bewirkt. Um diese Frage zu beantworten, ließen wir 8-12 Wochen alte gesunde NOD (n=5) und Diabetes-resistente NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Weibchen (n=5) zusammen mit diabetischen NOD Mäusen (n=9) in gemischten Käfigen leben. Die Mikrobiom-Analysen einschließlich der Bioinformatik wurden durch unsere Kooperationspartner im UC Davis MMPC Microbiome and Host Response Core durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die deutlich eingeschränkte alpha-Diversität des Mikrobioms (Abb. 15.A) als auch eine deutlich veränderte  $\beta$ -Diversität der diabetischen NOD Maus (Bray-Curtis und Jaccard Methode, nicht gezeigt) im Vergleich zu den prädiabetischen  $\alpha 4$ -kompetenten und

diabetes-resistenten  $\alpha 4$ -defizienten Mäusen welche wiederum eine sehr ähnliche alpha- und beta-Diversität zeigen.



**Abbildung 15** Mikrobiom-Analyse in nicht-diabetischen und diabetischen  $\alpha 4$ -kompetenten NOD sowie in Diabetes-resistenten NOD.  $\alpha 4$ -/- Mäusen. **A:** Shannon-Index der alpha-Diversität je nach Genotyp und Erkrankung zeigt ein vergleichsweise eingeschränktes Mikrobiom in der diabetischen NOD Maus. **B:** Analyse der Abundanz verschiedener Taxa zeigt das Erscheinen von *Bacteroides* und den fast vollständigen Verlust von *Ruminococci*, *Candidatus Saccharimonas* und *Prevotellaceae* in der diabetischen NOD Maus.

Auffällig ist außerdem die in Abbildung 15B gezeigte Nachweisbarkeit von *Bacteroides* im Mikrobiom der diabetischen NOD-Kohorte, einem Bakterium, welches im Mikrobiom der gesunden Kohorten völlig abwesend ist. Andererseits sind die Taxa *Ruminococci*, *Candidatus Saccharimonas* und *Prevotellaceae*, welche in unseren gesunden  $\alpha 4$ -kompetenten und  $\alpha 4$ -defizienten Kohorten konsistent vorhanden sind, völlig ausgelöscht. Weder wird die physiologische, möglicherweise „schützende“ Flora auf die diabetischen Mäuse noch die möglicherweise „ansteckende“ Flora der diabetischen Mäuse auf die nicht-diabetischen Mäuse übertragen, was eine umgekehrte Kausalität impliziert, der zufolge die diabetische Stoffwechsellage (mutmaßlich indirekt) die Mikrobiota im Darm verändert.



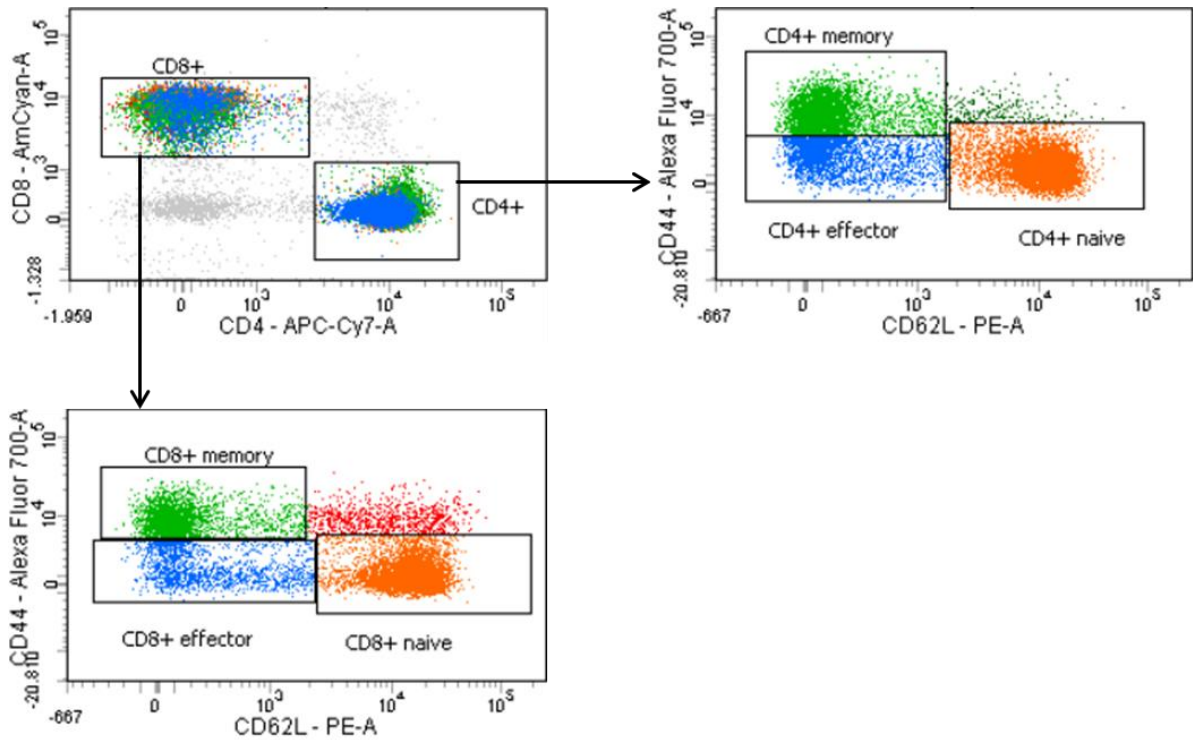
### 3.4. Analyse des zellulären Immunsystems der NOD.α4-/- Maus

Der Typ 1 Diabetes ist eine primär T-Zell vermittelte Erkrankung.<sup>41</sup> Diese Erkenntnis rührt initial daher, dass ein adoptiver T-Zell Transfer Diabetes in murinen Empfängern auslösen kann. Trotz des gewonnenen Wissens über die Rolle von B-Zellen und Makrophagen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes bleibt das Hauptaugenmerk auf die Interaktion von T-Zellen gegenüber Inselzellantigenen gerichtet. Unsere Daten (Anwesenheit von Antikörpern in der NOD.α4-/- Maus, wenn auch quantitativ weniger, reicht nicht aus, um eine Insulinitis oder Diabetes auszulösen; Transfer von CD3+ Zellen alleine reicht aus um Diabetes in NOD.α4-/- Empfängern auszulösen; Abwesenheit von endogenen α4-inkompetenten Makrophagen in den Pankreata der T-Zell Transfer-Empfänger) beschreiben eine exklusive Rolle der T-Zellen für die Diabetes Entstehung. In den letzten Jahren konnten immer genauere Aussagen über Sensibilisierung, Expansion und Epitope-Spreading von Inselzellantigen-spezifischen T-Zellen lange vor dem Auftreten erster Blutzucker-Entgleisungen getroffen werden.<sup>74;77;78</sup> Um die Auswirkungen der embryonalen α4-Ablation auf hämatopoetischen Zellen in der NOD Maus zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen von T-Zell-Subtypen in verschiedenen hämatopoetischen Kompartimenten, von autoreaktiven zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen als auch von intrazellulärem IFN $\gamma$  nach *in vitro* Stimulation mit IGRP, einem für die zelluläre Autoimmunität (sowohl CD8+ als auch CD4+ vermittelt) kritischen inselzellspezifischen Antigen, durchgeführt. Schließlich wurde überprüft, ob die *per se* vor Diabetes geschützte NOD.α4-/- Maus nach adoptivem CD3+ als auch nach CD4+ T-Zell Transfer von diabetischen Spendern erkrankt. Im Falle des CD3+ T-Zell Transfers erfolgte zusätzlich ein *ex vivo* Biolumineszenz-Imaging in der Absicht, die Migration der T-Zellen in ausgewählte Gewebe zu untersuchen.

#### 3.4.1. T-Zell-Subtypen

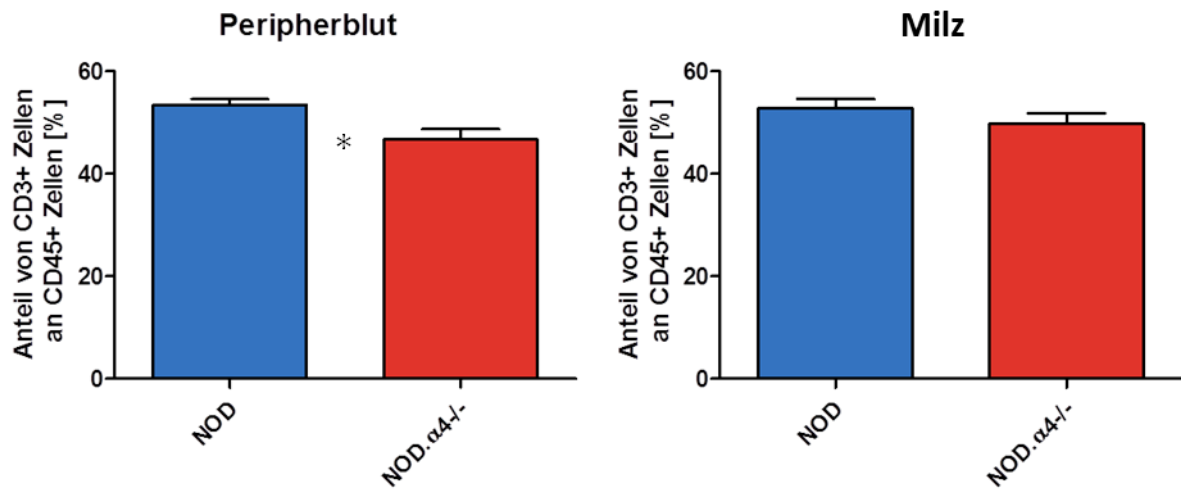
Im Mausmodell können sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen basierend auf ihre Expression von Oberflächenproteinen in Effektor, Gedächtnis als auch naive Zellen unterteilt werden. Naive T Zellen exprimieren vermehrt CD62L und

kaum CD44 auf ihrer Oberfläche, während Gedächtnis T-Zellen hohe Level CD44 und kaum CD62L exprimieren. Effektor T Zellen exprimieren wie Gedächtnis T-Zellen kaum CD62L und gleichzeitig weniger CD44 (CD44<sup>dim</sup>). Das in Abbildung 3.5. dargestellte Gating zeigt die durchflusszytometrische Analyse von NOD Splenozyten beispielhaft analog der Arbeiten von Barclay und Janeway.<sup>79;80</sup>

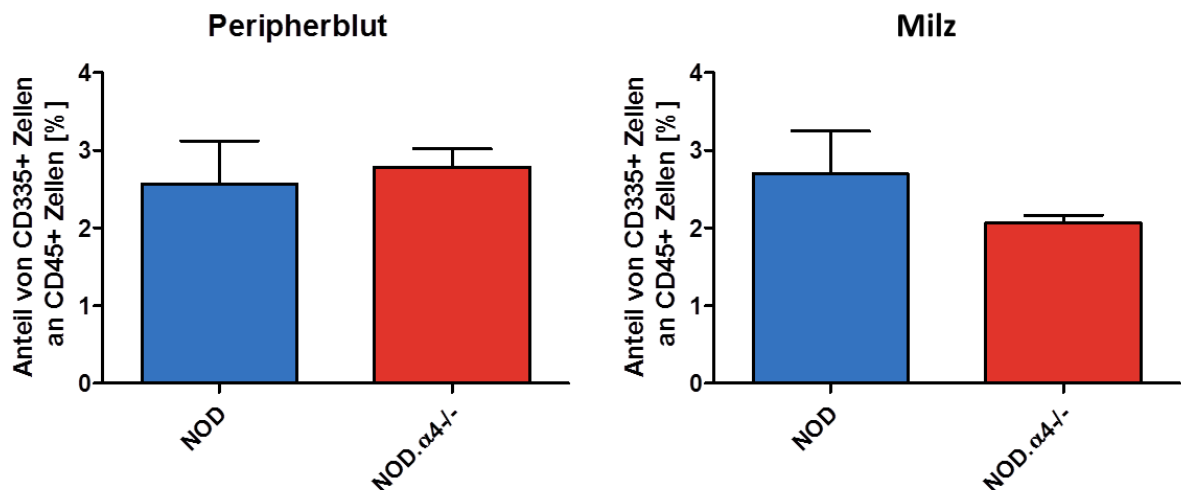


**Abbildung 16. Gating-Strategie für T-Zell-Subtypenanalyse.** Nach initialem morphologischem Gating und Doubletten-Ausschluss erfolgte eine sequentielle Auftrennung in CD45 und CD3. CD3+ Zellen wurden in CD4+ oder CD8+ Zellen unterteilt, welche jeweils auf ihre CD44 und CD62L Expression hin analysiert wurden. Gedächtnis T-Zellen wurden als CD44<sup>high</sup> und CD62L<sup>low</sup>, naive T-Zellen als CD62L<sup>high</sup> und CD44<sup>low</sup> und Effektor T-Zellen als CD44<sup>dim</sup> und CD62L<sup>low</sup> erkannt.

In der Betrachtung der Gesamtheit von CD3+ Zellen an Leukozyten zeigt sich im Peripherblut eine geringfügig verminderte Frequenz von  $47,1 \pm 2,8\%$  in der untersuchten NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus im Vergleich zu den NOD Kontrolltieren ( $55,1 \pm 1,0\%$  in der NOD Maus;  $p = 0,04$ ), während die Frequenz an CD3+ Zellen in der Milz keinen Unterschied in beiden Kohorten ergab (s. Abb 17.). In einer zusätzlichen Färbung von CD335 wurde die Frequenz von NK-Zellen an der Gesamtanzahl an Leukozyten in Peripherblut und Milz erfasst, ohne dabei signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der  $\alpha 4$  Kompetenz festzustellen (s. Abb. 18).



**Abbildung 17. Frequenz von CD3+ T-Zellen unter den Leukozyten.** Mittlere Frequenz  $\pm$  SEM in NOD (n=4) und NOD.α4-/- (n=5). Links ist die Verteilung im Peripherblut, rechts in der Milz dargestellt.

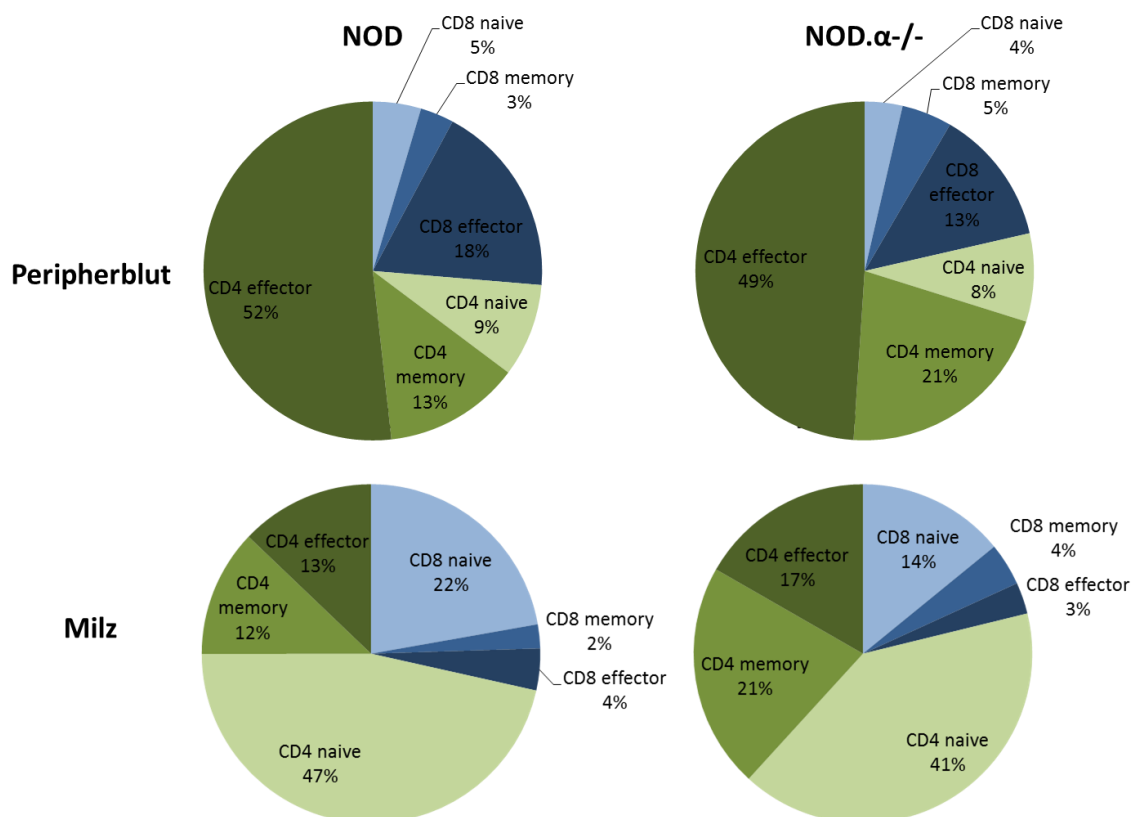


**Abbildung 18. Frequenz der NK-Zellen (CD335+) unter den Leukozyten.** Mittlere Frequenz  $\pm$  SEM in NOD (n=4) und NOD.α4-/- (n=5). Links ist die Verteilung im Peripherblut, rechts in der Milz dargestellt.

Offensichtliche qualitative Unterschiede im T-Zell-Kompartiment zwischen der NOD und der NOD.α4-/- Maus sind nicht zu erkennen. Bei der quantitativen Betrachtung der Verteilung von CD8+ und CD4+ Zellen innerhalb der CD3+ Population ergibt sich im Peripherblut der NOD.α4-/- Maus eine leicht verminderte Frequenz CD8+ Zellen mit  $21,4 \pm 0,2\%$  im Vergleich zu  $25,9 \pm 1,7\%$  in der NOD Maus ( $p=0,04$ ) zugunsten der Frequenz von CD4+ Zellen mit  $75\% \pm 0,3\%$  im Vergleich zu  $70,9 \pm 1,7\%$  in der NOD Maus ( $p=0,06$ ). In den

Subtypen unter den CD8+ und CD4+ Zellen ergab sich abgesehen von einer erhöhten Frequenz CD4+ Gedächtniszellen mit  $22,6 \pm 1,8\%$  im Vergleich zu  $15,5 \pm 1,9\%$  in der NOD Maus ( $p=0,03$ ) keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede. Biologisch signifikante Konsequenzen aus diesen eher geringen quantitativen Unterschieden erscheinen wenig wahrscheinlich.

Bezüglich der Verteilung der T-Zell Subtypen in der Milz zeigt sich ebenfalls eine verminderte Frequenz CD8+ Zellen ( $20,2 \pm 0,5\%$  vs.  $26,8 \pm 1,5\%$ ,  $p = 0,002$ ) zugunsten einer erhöhten Frequenz CD4+ Zellen ( $75,3 \pm 0,4\%$  vs.  $67,5 \pm 1,4\%$ ,  $p = 0,0005$ ). Unter den CD8+ Zellen zeigt sich eine deutlich verminderte Frequenz naiver CD8+ Zellen ( $11,8 \pm 0,4$  vs.  $19 \pm 1,3\%$ ) und eine leicht erhöhte Frequenz CD8+ Effektor Zellen ( $4,1 \pm 0,4\%$  vs.  $2,5 \pm 0,5\%$ ,  $p = 0,03$ ). Innerhalb der CD4+ Zellen zeigte sich ebenfalls eine verminderte Fraktion naiver CD4+ Zellen ( $34,7 \pm 1\%$  vs.  $39,1 \pm 0,4$ ,  $p = 0,02$ ) und eine erhöhte Frequenz an Effektor CD4+ Zellen ( $24,5 \pm 0,3$  vs.  $14 \pm 1,4\%$ ,  $p = 0,001$ ). Die Unterschiede sind jeweils quantitativ wenig beeindruckend und funktionell mutmaßlich irrelevant.

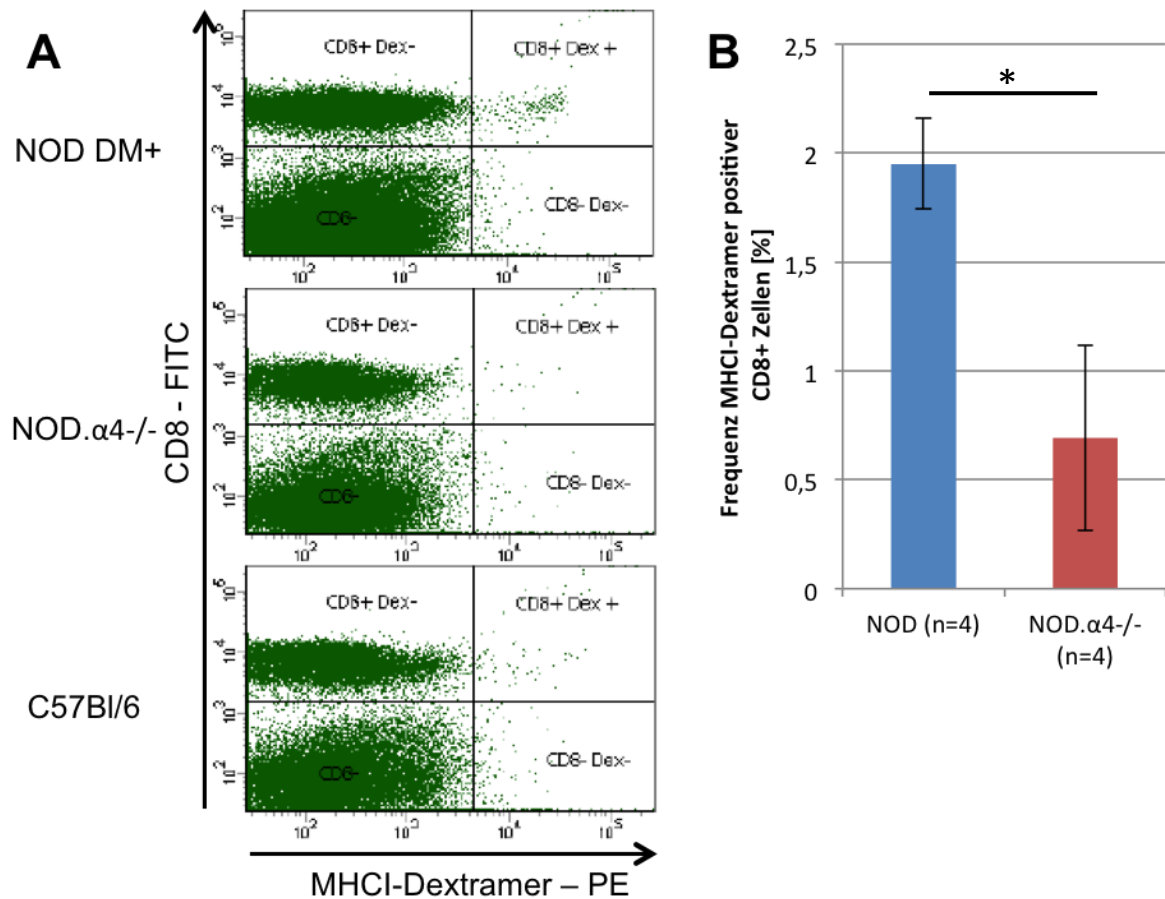


**Abbildung 19** Relativer Anteil der T-Zell-Subtypen in NOD (links, n=4) und NOD.alpha-/- Mäusen (rechts, n=5) bezogen auf CD3+ T-Zellen. In der oberen Zeile ist Verteilung im

Peripherblut, in der unteren Zeile in der Milz dargestellt. Das grüne Kompartiment beinhaltet die verschiedenen CD4+ Populationen, während das blaue Kompartiment die CD8+ Populationen aller CD3+ T-Zellen darstellt. CD4+ und CD8+ Zellen wurden jeweils in naive, Gedächtnis- oder Effektor-Zellen unterteilt.

### 3.4.2. Inselzell-reaktive zytotoxische T-Zellen

Eine stattgehabte humorale Sensibilisierung lässt sich unschwer durch den Nachweis spezifischer Antikörper auch quantitativ diagnostizieren, wobei die vorherrschende Isotyp-Klasse Aussagen über Zeit und Ort der Sensibilisierung machen kann. Im Gegensatz dazu bleibt der T-Zell-Rezeptor zellständig, ist niedrigaffin (Dissoziationskonstante 50  $\mu\text{M}$ ; 10000-fach schwächer als eine typische Antikörper-Antigen Interaktion) und ist durch seine MHC-Restriktion zusätzlich nur mit MHC-angepassten Spezialreagenzien zu erkennen.<sup>81</sup> Alternativ kann nach Antigenexposition eine Zytokinfreisetzung (auch auf Einzelzellniveau) gemessen werden, wobei Antigene in ihrer Fähigkeit, proinflammatorische Zytokine zu induzieren, erheblich variieren. Multimerisierte Peptid (Antigen)-MHC-Komplexe zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen, insbesondere Klasse II-Reagenzien, wurden erst kürzlich verfügbar und so konnte die Rolle des  $\alpha 4$ -Integrins für die Sensibilisierung oder die antigenabhängige Expansion und Gewebeeinfiltration bisher noch nicht untersucht werden.<sup>73</sup>



**Abbildung 20 Detektion inselzellreaktiver zytotoxischer T-Zellen. A:** Exemplarische FACS-Analysen von T-Zellen im Peripherblut, welche mit MHC-I Dextramer H-2Kd/VYLKTNVFL gefärbt wurden. Das MHC-I Reagenz bindet nur an T-Zellen, welche das präsentierte Inselzell-Antigen erkennen und somit bereits gegen dieses (immundominante und frühe) Inselzell-Antigen sensibilisiert sind. Von oben nach unten sind Dotplots von je einer diabetischen NOD, einer 40 Wochen alten NOD $\alpha$ 4 $^{-/-}$  und als Negativkontrolle einer MHC-disparaten C57Bl/6 Maus dargestellt. **B:** Frequenz MHC-I Dextramer H-2Kd/VYLKTNVFL positiver zytotoxischer T-Zellen in diabetischen  $\alpha$ 4-kompetenten NOD und NOD $\alpha$ 4 $^{-/-}$  Weibchen unter allen CD8+ Zellen nach Subtraktion des Mittelwerts der Negativkontrolle (MW $\pm$  SEM p=0.04; NOD, NOD $\alpha$ 4 $^{-/-}$  und C57Bl/6 jeweils n=4). Inselzellantigen-reaktive T-Zellen werden also in  $\alpha$ 4 $^{-/-}$  Mäusen induziert, Sensibilisierung ist demnach  $\alpha$ 4-unabhängig, während die offenbar  $\alpha$ 4-abhängige Expansion bei den  $\alpha$ 4 $^{-/-}$  Mäusen ausbleibt.

Bei der Detektion autoreaktiver zytotoxischer T-Zellen in der NOD Maus wurde das kommerziell erhältliche MHC-I Dextramer H-2Kd/VYLKTNVFL (einem Epitop der katalytischen Untereinheit der Inselzell-spezifischen Glucose-6-Phosphatase, einem kritischen Autoantigen in der Pathogenese des T1D<sup>74</sup> genutzt, das spezifisch an T-Zell-Rezeptoren bindet, welche das inselzellspezifische Peptid-MHC Dextramer Komplex H-2Kd/VYLKTNVFL erkennen. Hierzu wurden pro Maus etwa 200000 Leukozyten aus dem Peripherblut durchflusszytometrisch analysiert. Neben Blutproben von jeweils 4 NOD und NOD $\alpha$ 4 $^{-/-}$  Mäusen wurden als Negativkontrolle (unspezifische

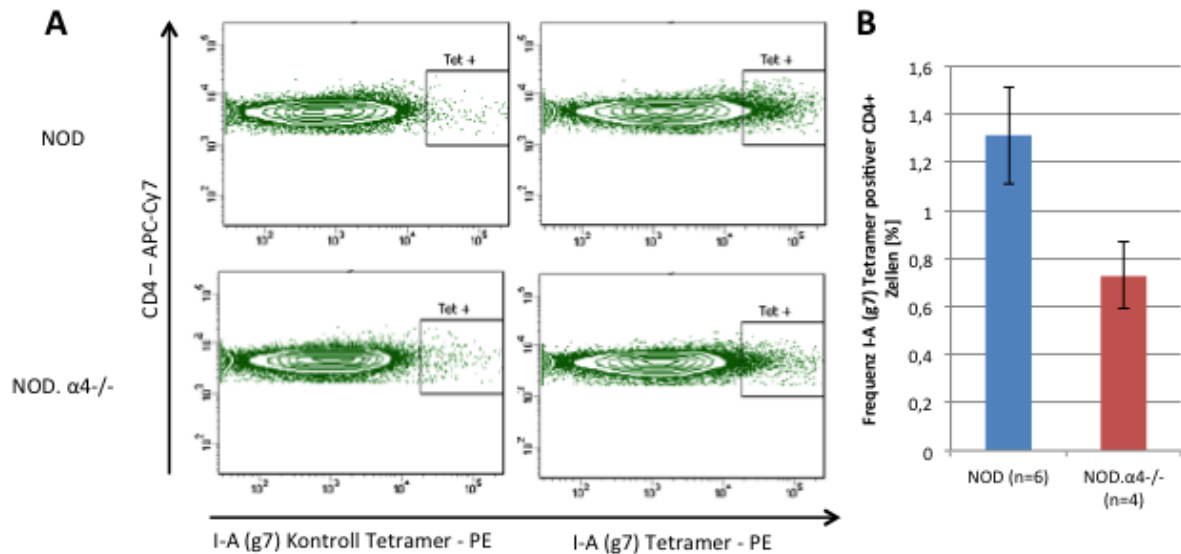
Dextramerbindung) ebenfalls 4 MHC-disparate C57Bl/6 Mäuse mit dem Reagenz untersucht. Die Färbungen MHC-disparater C57Bl/6 Mäuse wurden als biologische Negativkontrollen genutzt und die Frequenz der PE-positiven Ereignisse im CD8+ wurde von den beiden zu untersuchenden Kohorten subtrahiert. Abbildung 20.A zeigt exemplarische durchflusszytometrische Analysen von Peripherblutleukozyten, die mit anti-CD3, anti-CD8 und dem MHC-I Reagenz gefärbt wurden. CD3+ Zellen wurden gegatet und nach den Kriterien CD8+ (Y-Achse) und MHC I-Reagenz (X-Achse) weiter analysiert. Oben ist die Probe einer bereits an Diabetes erkrankten NOD Maus zu sehen, während darunter Proben einer 40 Wochen alten NOD.α4-/- Maus und einer C57Bl/6 Maus abgebildet sind. Nur die diabetische NOD Maus zeigt eine distinkte Population MHC-I Dextramer positiver CD8+ Zellen, aber auch die NOD.α4-/- Maus hat eine kleine Frequenz MHC-I Dextramer-positiver CD8+ Zellen. Abbildung 20.B zeigt die durchschnittliche Frequenz MHC-I Dextramer positiver CD8+ Zellen in der untersuchten NOD ( $1,9 \pm 0,2\%$ ) und NODα4-/- Kohorte ( $0,7 \pm 0,4\%$ ;  $p = 0,04$ ).

### 3.4.3. Inselzell-reaktive T-Helfer-Zellen

Die Detektion von antigenspezifischen T-Helfer-Zellen stellte sich anfangs im Vergleich zu MHC-I-spezifischen CD8+ Zellen wegen der Molekülstruktur von MHC II als technologisch schwieriger dar. Hier gelang der Durchbruch durch Fixierung der Peptide in einem definierten Register innerhalb des MHC-II Moleküls durch eine Disulfid-Bindung, um das Übergehen in andere, für eine Bindung instabilere Register zu verhindern.<sup>81</sup> Crawford *et al.* haben 2011 das Insulin B Peptid (EALYLVCGE) in verschiedenen MHC Bindungsregistern untersucht und konnten dabei erfolgreich T-Helfer Zellen aus den Insulitis-Infiltraten der NOD Maus detektieren.<sup>73</sup> Dieses experimentelle Reagenz wurde uns von der NIH TETRAMER FACILITY (Atlanta, GA) für diese Arbeit zur Detektion gegen Insulin B sensibilisierter autoreaktiver T-Helfer Zellen im Peripherblut zur Verfügung gestellt. Abbildung 3.10.A zeigt exemplarische FACS-Analysen von CD4+ T-Zellen im Peripherblut, welche mit dem angesprochenen MHC-II Tetramer angefärbt sind. Links sind Färbungen mit einem Kontrollpeptid (AMKRHGLDNYRGYSL) im MHC-II Molekül und rechts



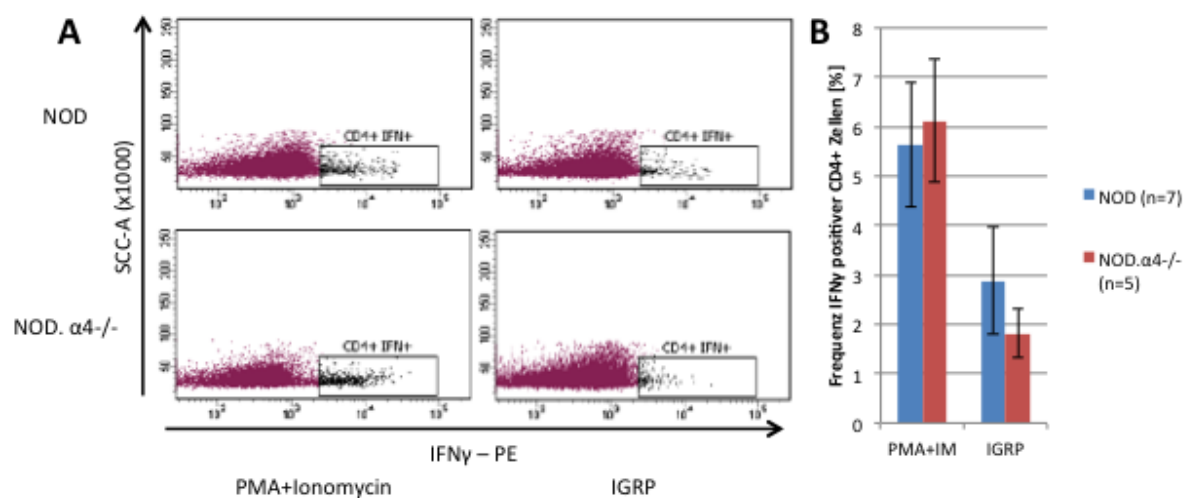
mit dem Insulin B Peptid dargestellt. Oben sind Blutproben von einer 20 Wochen alten NOD $\alpha$ 4 $^{-/-}$  und unten einer gleichaltrigen NOD Maus dargestellt. Abbildung 3.10.B zeigt die durchschnittliche Frequenz der MHC-II Tetramer positiven CD4 $^{+}$  Zellen der NOD $\alpha$ 4 $^{-/-}$  ( $1,3\pm 0,2\%$ ,  $n=6$ ) und NOD ( $0,7\pm 0,1\%$ ,  $n=4$ ) Kohorte nach Abzug der Frequenz der Negativkontrolle (irrelevantes Peptid) im Peripherblut an ( $p = 0,07$ ).



**Abbildung 21. Detektion Inselzell-reaktiver T-Helfer-Zellen. A:** Exemplarische FACS-Analysen von CD4 $^{+}$  T-Zellen im Peripherblut, welche mit MHC-II Tetramer gefärbt wurden (nach Gaten auf CD3 $^{+}$ /CD4 $^{+}$  Zellen). Das MHC-II Reagenz bindet nur an T-Zellen, welche das präsentierte Insulin-Antigen erkennen und somit bereits gegen Insulin sensibilisiert sind. Oben sind Analysen von einem 20 Wochen alten NOD Weibchen und unten von einem ebenfalls 20 Wochen alten NOD. $\alpha$ 4 $^{-/-}$  Weibchen dargestellt. Links sind MHC-II-Reagenzien gekoppelt mit einem irrelevanten Kontrollpeptid (AMKRHGLDNYRGYSL) und rechts gekoppelt mit dem zu untersuchenden Insulin-B-Peptid (EALYLVCGE) dargestellt. **B:** Frequenz MHC-II Tetramer positiver T-Helfer-Zellen in 20 Wochen alten NOD und NOD. $\alpha$ 4 $^{-/-}$  -Weibchen nach Subtraktion der individuellen Kontrollfärbung mit MHC-II Kontroll-Tetramer (MW $\pm$  SEM;  $p=0,07$ ;  $n=6$  NOD und  $n=5$  NOD  $\alpha$ 4 $^{-/-}$ ).

Nach der Detektion einer erhöhten Frequenz autoreaktiver T-Helfer Zellen wurde, um die phänotypischen Analysen auch funktionell zu korrobrieren, ein funktioneller IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay durchgeführt, um die IFN $\gamma$ -Sekretion nach Antigenkontakt zu untersuchen. PMA und Ionomycin führen über Querverlinkung von Oberflächenproteinen und Blockade von Calciumkanälen zu unspezifischer T-Zell-Aktivierung und damit einhergehender IFN $\gamma$  Sekretion, welche hier als Positivkontrolle eingesetzt wurden.<sup>82</sup> Hierbei sollte untersucht werden ob NOD Splenozyten und allen voran NOD CD4 $^{+}$  Splenozyten nach Kontakt zu einem inselzellspezifischen Antigen (IGRP) in einer erhöhten

Frequenz IFN $\gamma$  sezernieren. Hierzu wurden Splenozyten aus Milzen gewonnen und *in vitro* stimuliert. Daraufhin wurden die Splenozyten fixiert, permeabilisiert und anschließend eine Oberflächenfärbung sowie die intrazelluläre IFN $\gamma$  Färbung angesetzt. Abbildung 22.A zeigt die exemplarische durchflusszytometrische Analyse von CD4 $^{+}$  Splenozyten nach sechsständiger Exposition zu PMA+ Ionomycin (linke Spalte) oder zu dem inselzellspezifischen Antigen IGRP (rechte Spalte). Oben sind Proben aus der Milz einer NOD $\alpha$ 4 $^{-/-}$  und unten einer NOD Maus aufgetragen. Abbildung 22.B zeigt die Frequenz CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{+}$  Splenozyten. Zuvor wurden die Frequenzen in den unstimulierten Negativkontrollen von den individuellen CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{+}$  Frequenzen subtrahiert. Die allesamt 16 Wochen alten NOD. $\alpha$ 4 $^{-/-}$  Männchen (n=5) weisen in der Positivkontrolle eine Frequenz von  $5,6 \pm 1,3\%$  und mit dem zu untersuchenden IGRP Peptid eine Frequenz von  $3 \pm 1\%$  an CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{+}$  Zellen auf. Selbige Frequenzen von NOD CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$  $^{+}$  Zellen an NOD Splenozyten lagen bei  $6,1 \pm 1,2\%$  und für das zu untersuchende IGRP Peptid bei  $1,8 \pm 0,5\%$  (n=7, p = 0,5) und zeigten somit keine signifikant erhöhte IFN $\gamma$  Sekretion nach Antigenkontakt auf. NOD. $\alpha$ 4 $^{-/-}$  T-Zellen sind somit sowohl insgesamt ähnlich kompetent, IFN $\gamma$  zu sezernieren wie  $\alpha$ 4-kompetente NOD T-Zellen, als auch ihre IGRP-Reagibilität ähnlich hoch ist. Der Umstand, dass NOD. $\alpha$ 4 $^{-/-}$  Mäuse gegen Diabetes gefeit sind, ist also nicht einer T-Helferzell-Anergie zuzuschreiben.

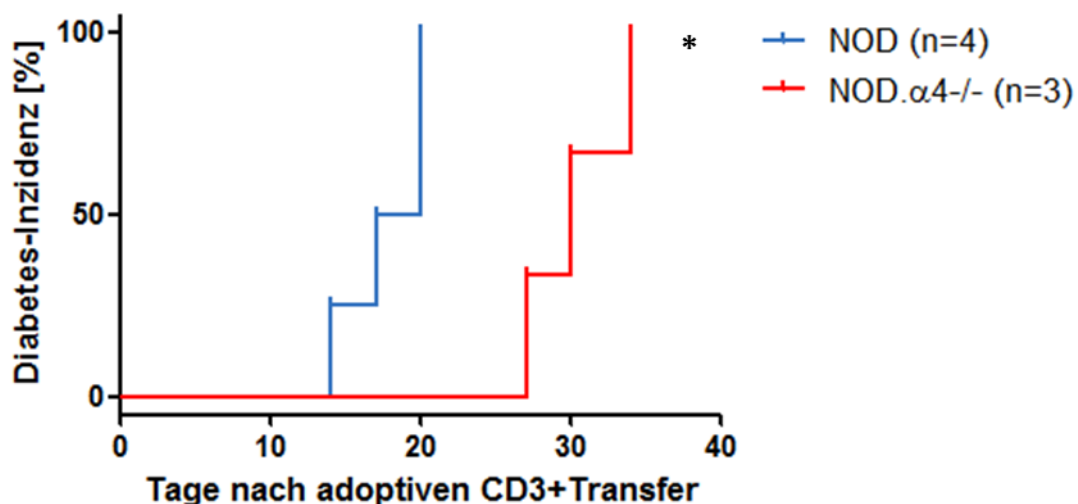


**Abbildung 22 Induzierte IFN $\gamma$ -Sekretion von T-Helfer-Zellen.** A: Exemplarische FACS Analysen von CD4 $^{+}$  Splenozyten, welche zuvor 6 Stunden *in vitro* mit PMA und Ionomycin als Positivkontrolle oder einem Peptid (VYLKTNVFL) der katalytischen Untereinheit der murinen inselzellspezifischen Glucose-6-Phosphatase inkubiert wurden. Oben sind Analysen von einem

16 Wochen alten NOD Männchen, unten von einem gleichaltrigen NOD.α4-/- Männchen dargestellt. In der linken Spalte befinden sich die Positivkontrollen und in der rechten die mit inselzellspezifischem Antigen inkubierten Proben (IGRP). **B:** Frequenz IFN $\gamma$  positiver T-Helfer-Zellen in 16 Wochen alten NOD (n=7) und NOD.α4-/- (n=5) Männchen nach Subtraktion der individuellen Färbung der Negativkontrolle (MW $\pm$  SEM; p=0,5).

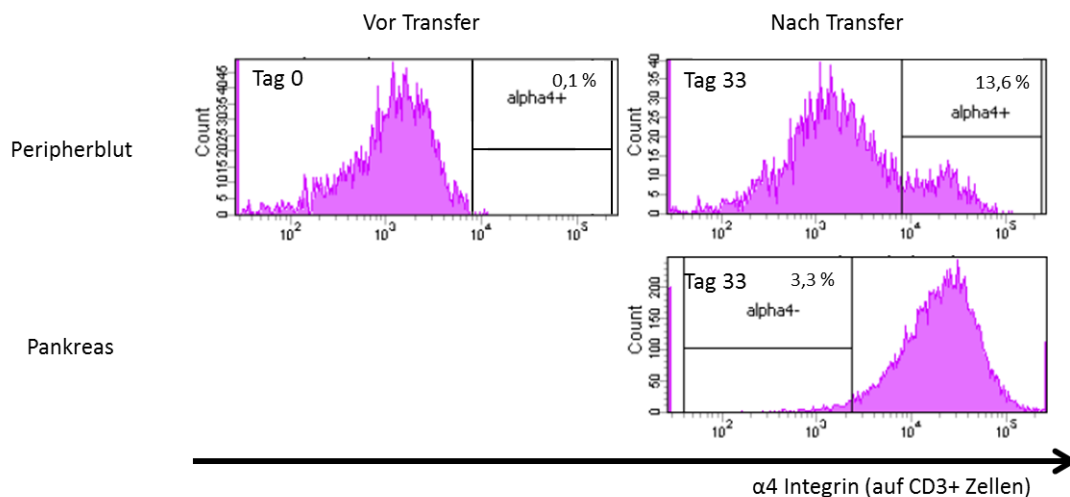
### 3.4.4.1. Adoptiver CD3+ T-Zell-Transfer

Wie in Abbildung 12 gezeigt, ist die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus gegenüber der Entstehung des NOD-charakteristischen Autoimmun-Diabetes gefeit. Auch die von der NOD-Maus abgeleitete, MHC-identete und alle „Diabetes Susceptibility Loci“ tragende, aber wegen Defekten bei der Antigenrezeptor-Rekombination B- und T-Zell-depletierte NOD.*scid* Maus entwickelt keinen Diabetes. Im Gegensatz zur NOD.*scid* Maus besitzt die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus jedoch ein Immunsystem mit grundsätzlich immunkompetenten Lymphozyten.<sup>42</sup> NOD.*scid* Mäuse werden nach Transfer von CD4+ und CD8+ Zellen diabetischer NOD Mäuse, nicht aber bei Transfer nur einer der beiden Populationen, mit kurzer, bedingt dosisabhängiger Latenz und hoher Penetranz diabetisch. Um zu überprüfen, ob die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus ebenfalls in der Lage ist, nach Transfer  $\alpha 4$ -kompetenter diabetogener T-Zellen einen Typ 1 Diabetes zu entwickeln, wurde ein adoptiver CD3+ T-Zell Transfer, wie in Kapitel 2.2.1.8. beschrieben, durchgeführt. Während zwischen Tag 14 und 20 nach CD3+ T-Zell Transfer alle 4 NOD Empfänger an Diabetes erkrankten, erkrankten alle NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse etwa 2 Wochen später zwischen Tag 27 und 34 ( $p = 0,02$ ).



**Abbildung 23. Adoptiver CD3+ T-Zell-Transfer.** Diabetes-Prävalenz von weiblichen 8-12 Wochen alten NOD (blau, n=4) und NOD. $\alpha 4^{-/-}$  (rot, n=3) Empfängern. Nach subletaler Bestrahlung der Empfänger mit 6.5 Gy wurden  $5 \times 10^6$  CD3+ Splenozyten von diabetischen Spendern transferiert ( $p=0,02$ ).

Die  $\alpha 4$ -Defizienz der T-Zellen der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger erlaubte die einfache durchflusszytometrische Differenzierung von Empfänger- und Spender-T-Zellen nach CD3+ T-Zell Transfer. An Tag 33 nach Transfer von NOD Splenozyten in NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse waren 13,6% der Peripherblut-T-Zellen vom Spendertyp (Abbildung 24). Wie oben gezeigt, sind NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Pankreata frei von lymphozytären Infiltraten. Um zu untersuchen, ob die adoptiv transferierten diabetogenen NOD T-Zellen im Rahmen der Insel-Infiltration auch  $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger-T-Zellen in das entzündete Pankreas rekrutieren können, wurden die Pankreata der 3 inzwischen diabetischen NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse an Tag 33 nach Transfer entnommen und verdaut, um die CD3+ T Zellen in den Organen durchflusszytometrisch auf  $\alpha 4$  Expression zu untersuchen. Wie in Abb. 24. gezeigt, war trotz des erheblichen Überschusses an  $\alpha 4^{-/-}$  T-Zellen im Blut keine erkennbare Population von Empfängertyp-T-Zellen aus den Pankreata zu isolieren. Diese Daten belegen einen qualitativen Migrationsdefekt  $\alpha 4^{-/-}$  T-Zellen auch in entzündeten Geweben. Nachdem  $\alpha 4$ -kompetente T-Zellen allein ausreichen, um in NOD. $\alpha 4^{-/-}$  einen Diabetes zu induzieren, können wir weiterhin schlussfolgern, dass die Rolle etwaiger anderer Blutzellen (Makrophagen, B-Zellen) bei der Diabetesentstehung  $\alpha 4$ -unabhängig, wenn nicht sogar vollständig redundant ist.



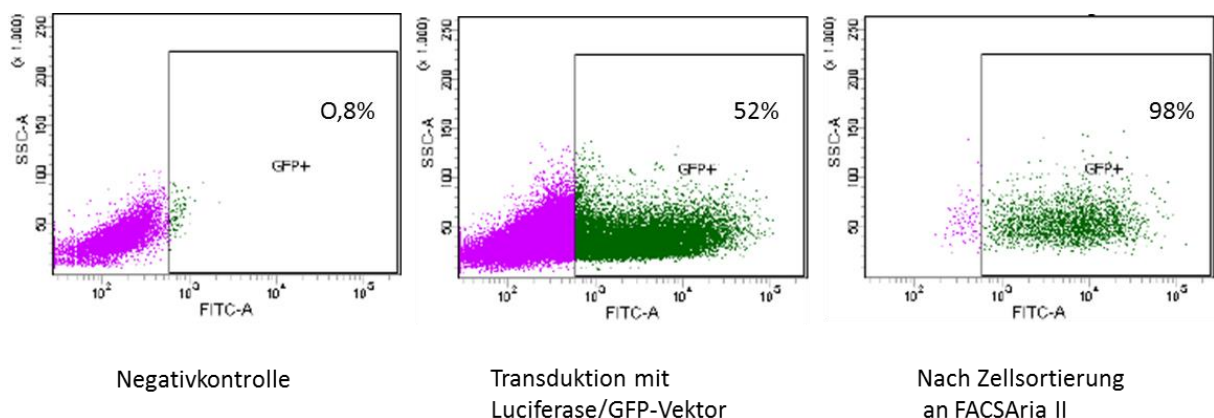
**Abbildung 24**  $\alpha 4$ -Expression von Peripherblut- und Pankreas-infiltrierenden Lymphozyten von NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäusen nach adoptivem CD3+ T-Zell-Transfer diabetischer Spender. Obere Reihe: Vor Transfer (links) vollständig  $\alpha 4$ -negativ, findet sich einen Monat nach Transfer eine deutliche Population (ca. 13,6%)  $\alpha 4$ -positiver Spenderlymphozyten im Peripherblut. Untere Reihe: Aus verdauten Pankreata extrahierte infiltrierende Lymphozyten sind  $\alpha 4$ -positiv, d.h. ausschließlich vom Spendertyp. (X-Achse: Relative  $\alpha 4$ -Fluoreszenzintensität, Y-Achse: Zahl der Ereignisse. Für die Untersuchungen wurde wegen der

geringen Gesamt-Lymphozytenzahl, die aus einem Pankreas isoliert werden kann, Probenmaterial von jeweils drei Tieren vereinigt (ein Experiment).

#### 3.4.4.2. Ex vivo Luminographie nach adoptivem CD3+ T-Zell-Transfer

Nachdem sich im adoptiven CD3+ T-Zell Transfer ein signifikanter Unterschied in der Kinetik der Diabetes-Prävalenz zeigte, sollte untersucht werden, ob auch eine verlangsamte Migration der  $\alpha 4$ -kompetenten CD3+ T-Zellen in die Zielorgane Pankreas und *Gl. submandibularis* in der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus nachgewiesen werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass in der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus keine Insulitis nachgewiesen werden kann, erscheint es wahrscheinlich, dass transferierte CD3+ T-Zellen schneller in die entzündlich veränderten Langerhans-Inseln der NOD Kontrollgruppe migrieren als in die gesunden Langerhans-Inseln der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus.

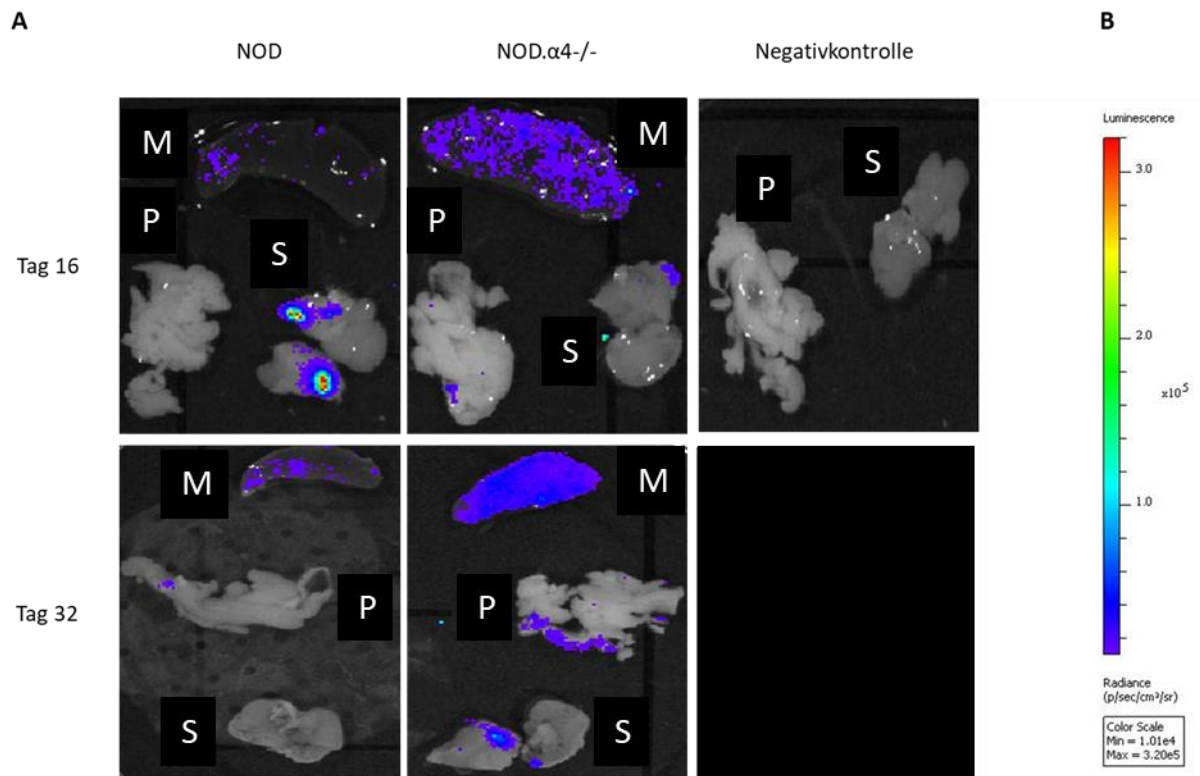
Zur Detektion der CD3+ T-Zellen wurde eine *ex vivo* Luminographie nach CD3+ T-Zell Transfer durchgeführt. Hierzu musste eine möglichst hohe Frequenz an mit Luciferase transduzierten CD3+ T-Zellen generiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Luciferase/GFP Vektor, welcher uns freundlicherweise von Prof. Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet.<sup>75</sup> Abbildung 25 zeigt die Generierung einer zu 52% positiven CD3+GFP+ Population nach Transduktion mit dem pSEW-luc2 Vektor. Diese Zellen wurden durch Zellsortierung am FACS Aria II zu einer homogen GFP+ (und somit Luciferase+) Population angereichert.



**Abbildung 25. FACS-Analysen von Splenozyten vor und nach lentiviraler Transduktion mit dem pSEW-luc2 Vektor und nach FACS-basierter Zellsortierung.**

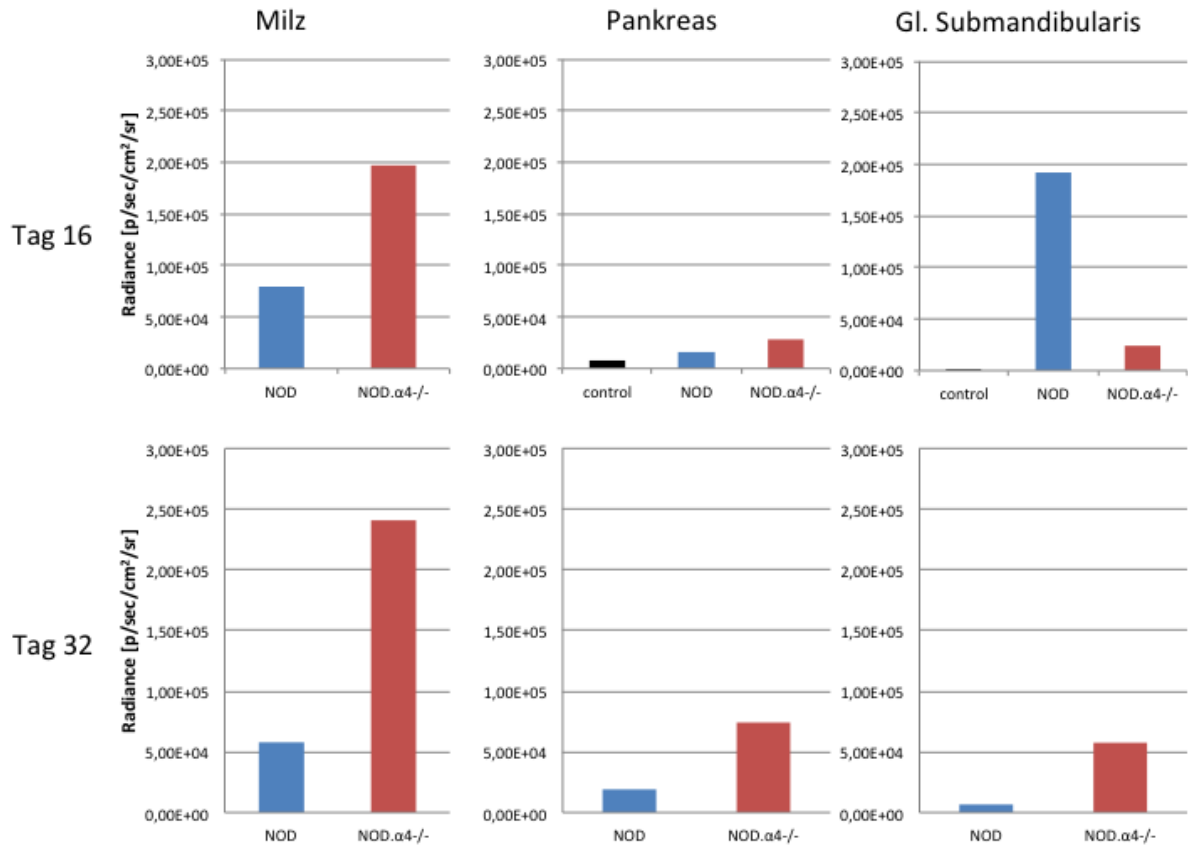
CD3+GFP+ Zellen wurden in einer Dosis von  $1 \times 10^6$  Zellen in jeweils 3 weibliche 8-12 Wochen alte subletal (6.5 Gy) bestrahlte NOD und NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger transferiert. Nach Diabetes-Diagnose einer NOD Maus an Tag 16 erfolgte die schmerzlose Tötung dieser NOD und einer NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus, sowie eines weiteren NOD Empfängers als Negativkontrolle (*Ex vivo* Luminographie ohne Luciferin Injektion) und an Tag 35 eine weitere schmerzlose Tötung von je einer weiteren NOD. $\alpha 4^{-/-}$  bzw. NOD Maus, beide zu diesem Zeitpunkt nicht-diabetisch. Abbildung 26A zeigt die *ex vivo* Luminographie 40 Minuten nach Luciferin-Gabe, anschließender schmerzloser Tötung und Organentnahme.

Trotz der Tatsache, dass es sich hierbei um einen Pilotversuch handelt und keine statistische Auswertung möglich ist, fällt auf, dass die höchste Zelldichte in den *Gl. submandibularis* der  $\alpha 4$ -kompetenten, diabetischen NOD Maus an Tag 16 nachgewiesen werden kann. Dies wird in Abbildung 27 in der graphischen Darstellung der Radiance der drei *Gl. submandibularis* an Tag 16 deutlich. Zweitens konnte unabhängig von Zeitpunkt und Genotyp eine bestenfalls minimale Radiance in den Pankreata gezeigt werden (s. Abb. 26). Möglicherweise ist die relative Fläche der Inseln innerhalb des Pankreas zu klein, um mit *in-situ* Lumineszenz Lymphozyteninfiltrate in Langerhans-Inseln darzustellen. Drittens zeigt sich zu beiden Zeitpunkten eine deutlich erhöhte Radiance in den Milzen der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse, die auch in den Aufnahmen in Abbildung 26. klar zu sehen ist. Dies liegt mutmaßlich daran, dass die  $\alpha 4$ -kompetenten CD3+GFP+ Zellen nach sublethaler Bestrahlung einen Repopulationsvorteil gegenüber den endogenen NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Lymphozyten haben. Im Falle der  $\alpha 4$  kompetenten NOD Maus fällt dieser Vorteil weg und es zeigt sich eine geringere Radiance als bei der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus.



**Abbildung 26. Ex-vivo Luminographie A:** Luminogramm von Milz, Pankreas und *Gl. submandibularis* an zwei Zeitpunkten nach adoptivem CD3+ T-Zell-Transfer. In der ersten Zeile sind Organe von 3 Mäusen 16 Tage nach Transfer dargestellt (NOD links, NOD. $\alpha$ 4-/- Mitte, Negativkontrolle rechts). In der zweiten Zeile sind Organe von zwei Spendern (NOD, NOD. $\alpha$ 4-/-) an Tag 32 nach Transfer dargestellt. **B:** Lumineszenz-Farbskala in Radiance (p/sec/cm<sup>2</sup>/sr) wurde auf einen dynamischen Bereich von 1.01e4 - 3.20e5 eingestellt. Je Zeitpunkt und Genotyp wurden Organe (M: Milz, P: Pankreas, S: *Glandula submandibularis*) einer Maus untersucht (vgl. quantitative Analysen in Abb. 16).





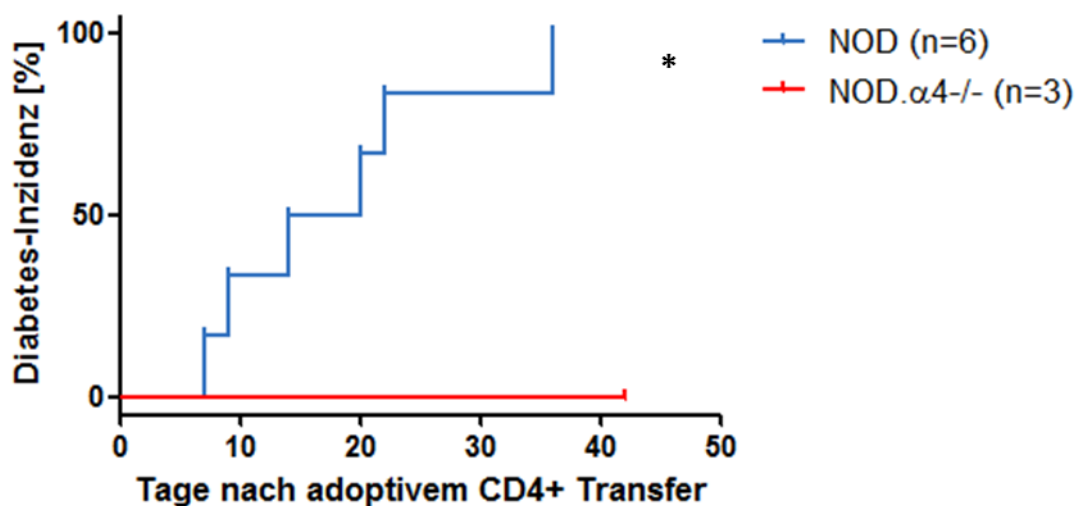
**Abbildung 27. Quantitative Analyse der Radiance nach *in vivo* Transfer Luciferase-markierter T-Zellen diabetischer Spendertiere.** In der oberen Zeile ist die Radiance der Organe von Tag 16, in der unteren Zeile von Tag 32 dargestellt. In den drei Spalten sind die jeweiligen Organe zum Vergleich nebeneinander dargestellt (von links nach rechts: Milz, Pankreas und *Gl. submandibularis*). Je Zeitpunkt und Genotyp wurden Organe einer Maus untersucht (vgl. *ex vivo* Luminogramme in Abb. 3.15., 1 Maus pro Genotyp und Zeitpunkt).

#### 3.4.4.3. Adoptiver CD4+ T-Zell Transfer

Christianson *et al.* konnten 1993 zeigen, dass neben adoptiven Transfers von Helfer- und zytotoxische T-Zellen enthaltenden Präparationen auch ein alleiniger CD4+ T-Zell Transfer in der Lage ist, in NOD.*scid* Mäusen (ohne endogene T-Zellen, also ohne notwendigerweise zytotoxische T-Zellen zu benötigen) Diabetes auszulösen, während CD8+ T-Zell Transfers alleine nicht dazu in der Lage waren.<sup>41</sup>

In den immunkompetenten NOD bzw. NOD.α4-/- Mäusen würden die CD4+ Helferzellen jedoch im Gegensatz zu den Experimenten mit NOD.*scid* Mäusen jeweils auf endogene CD8+ T-Zellen treffen und diese potenziell rekrutieren können, und so möglicherweise diabetogen wirken können. Im Gegensatz zu der Vielzahl bisher gezeigter Experimente, die theoretisch auch mit seriell

injizierten anti-funktionellen Antikörpern hätten gemacht werden können, wurden die adoptiven Transferexperimente mit Co-Existenz  $\alpha 4$ -kompetenter und  $\alpha 4$ -defizienter hämatopoetischer Zellen erst durch das neu entwickelte genetische Modell möglich. Um zu untersuchen, ob und in welcher Kinetik NOD. $\alpha 4$ -/- Mäuse im Vergleich zur NOD-Kontrollgruppe Diabetes entwickeln würden, wurden neben den adoptiven CD3+ T-Zell Transfers auch isolierte CD4+ T-Zell Transfers durchgeführt. Abbildung 28 zeigt die Diabetes-Prävalenz von weiblichen, 8-12 Wochen alten NOD (n=6) und NOD. $\alpha 4$ -/- (n=3) Empfängern nach subletaler Bestrahlung in einer Dosis von 6.5 Gy und anschließender Injektion von  $2,5 \times 10^6$   $\alpha 4$ -kompetenten CD4+ T-Zellen aus diabetischen Spendern. In Kontrast zum CD3+ T-Zell Transfer (Abbildung 23) entwickelte keiner der 3 NOD. $\alpha 4$ -/- Empfänger Diabetes innerhalb des Beobachtungszeitraums von 42 Tagen. 5 der 6 NOD Empfänger entwickelten zwischen Tag 7 und 22 Diabetes, der sechste an Tag 36 ( $p = 0,01$ ). NOD CD4+ Zellen sind also offenbar nicht in der Lage, NOD. $\alpha 4$ -/- CD8+ Zellen zu rekrutieren, was offenbar für die Diabetes-Entstehung kritisch ist.



**Abbildung 28 Adoptiver CD4+ T-Zell-Transfer diabetischer Spender auf nicht-diabetische,  $\alpha 4$ -kompetente oder -defiziente Empfänger.** Kinetik der Diabetesentstehung und Diabetes-Prävalenz weiblicher 8-12 Wochen alter NOD (blau, n=6) und NOD. $\alpha 4$ -/- (rot, n=3) Empfängern von  $2,5 \times 10^6$  CD4+ Milz-T-Zellen diabetischer Spender nach subletaler Bestrahlung der Empfänger mit 6.5 Gy ( $p=0,01$ ) (zwei Experimente).

### **3.5. Analysen der humoralen Achse des Immunsystems der NOD. $\alpha$ 4-/- Maus**

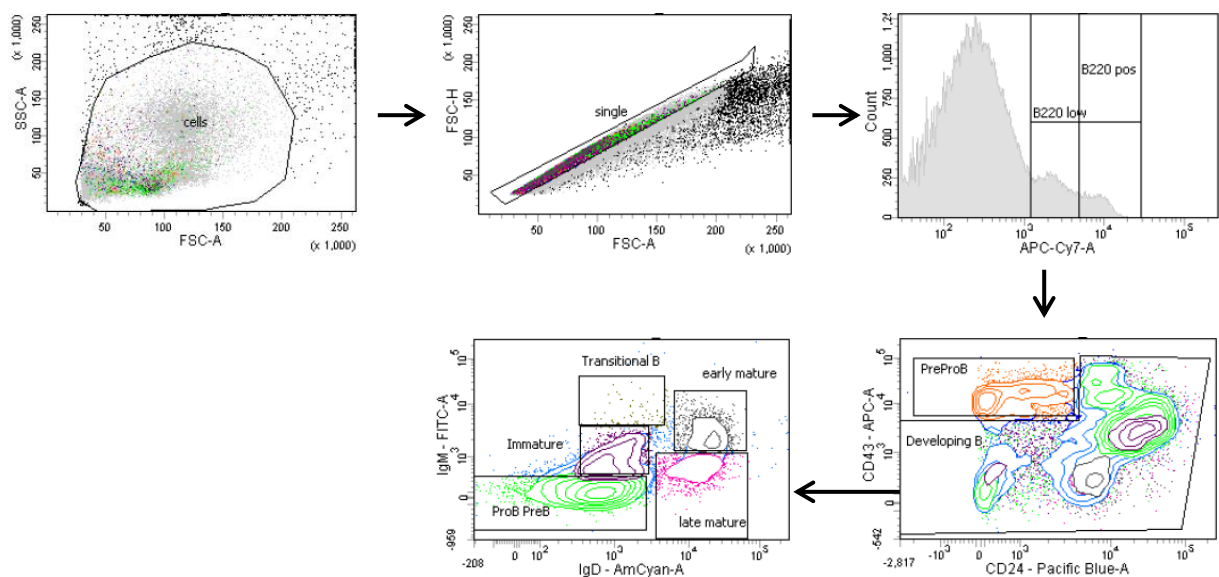
Eine Vielzahl von Untersuchungen hat sich der zellulären Immunkompetenz der NOD. $\alpha$ 4-/- Mäuse gewidmet. Die Ausbildung antigenspezifischer T-Zellen ist grundsätzlich  $\alpha$ 4 Integrin-unabhängig, die gestörte Gewebepenetration  $\alpha$ 4-negativer T-Zellen führt jedoch zu einer Attenuierung von Autoimmunerkrankheiten und Asthma bronchiale.<sup>49;57</sup> Analoge Untersuchungen zur humoralen Immunkompetenz wurden bisher nicht durchgeführt; da der „reife B-Zell-Rezeptor“, das Immunglobulin, sezerniert wird, sollte die humorale Immunkompetenz von NOD. $\alpha$ 4-/- Mäusen ausschließlich von der Abhängigkeit der Reifung, Sensibilisierung und Expansion der B-Zellen von  $\alpha$ 4 bestimmt werden. Einmal produziert werden Immunglobuline  $\alpha$ 4-unabhängig im Gesamtorganismus äquilibrieren und in typischer Weise zur Immunabwehr beitragen. Um die Auswirkungen der embryonalen  $\alpha$ 4-Ablation auf die B-Zellen der NOD Maus zu untersuchen, wurden daher zunächst durchflusszytometrische Analysen der B-Zellpopulationen in verschiedenen hämatopoetischen Kompartimenten durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Immunisierungsstudie angesetzt, um die Funktionalität der B-Zellen, und somit die generelle Fähigkeit zu testen, Antigen-spezifität zu erwerben und spezifische Antikörper zu produzieren. Schließlich wurden Insulin-Autoantikörper gemessen, um der Frage nachzugehen, inwieweit die B-Zellen der  $\alpha$ 4-Mangelmutante Antikörper gegen inselzellspezifische Antigene produzieren.

#### **3.5.1. B-Zell-Reifung**

B-Zellen durchlaufen eine Anzahl an Entwicklungsstadien vor und nach dem Kontakt zu Antigenen.<sup>83;84</sup> Im Laufe ihrer Reifung und Differenzierung entstehen verschiedene funktionell distinkte Populationen, die sich anhand differenter Expression von Oberflächenproteinen unterscheiden lassen. B-Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab, wo auch sie ihre ersten Entwicklungsschritte vollziehen. Die noch unreifen B-Zellen migrieren anschließend in sekundäre lymphatische Gewebe und vollziehen ihre weitere Reifung zu folliculären B-Zellen. Sobald der B-Zell-Rezeptorkomplex einer reifen B-Zelle, bestehend aus membrangebundenem IgM und IgD, ein fremdes

Antigen bindet, wird die B-Zelle aktiviert und differenziert zu einer Antikörper-sezernierende Plasmazelle.

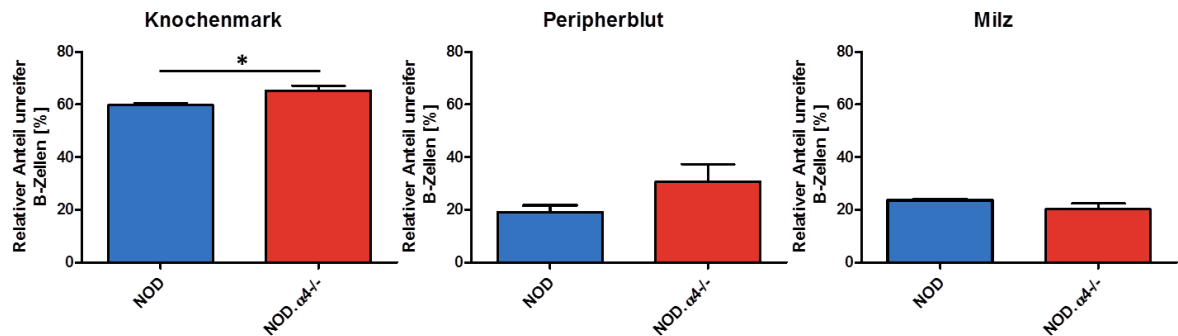
Durch die Kombination von Oberflächenmarkern können unterschiedliche Reifestadien der B-Zellen differenziert werden. PreproB-Zellen werden als  $CD43^+CD24^-$ , preB/proB als  $CD43^{+/+}CD24^+IgM^-IgD^+$ , unreife B-Zellen als  $CD43^-CD24^+IgM^{dim}IgD^-$ , transitionale B-Zellen als  $CD43^-CD24^+IgM^+IgD^-$ , ein frühes B-Zellreifestadium als  $CD43^-CD24^+IgM^+IgD^+$  und ein spätes B-Zellreifestadium als  $CD43^-CD24^+IgM^{dim/low}IgD^+$  definiert.<sup>85;86</sup> Abbildung 29 zeigt die adaptierte Gating-Strategie am Beispiel einer NOD Knochenmark-Probe.



**Abbildung 29. Gating-Strategie der B-Zell-Entwicklungsstadien.** Nach dem initialen morphologischen Gating auf „alle Leukozyten“ und Doubletten-Ausschluss über FSC-A/FSC-H-Abgleich erfolgte eine Färbung mit anti-B220. B220+ Zellen wurden auf ihre CD43 und CD24 Expression hin untersucht. PreProB Zellen wurden als B220+CD43+CD24- erkannt, während die restlichen Zellen auf ihre IgM und IgD Expression hin weiter untersucht wurden.

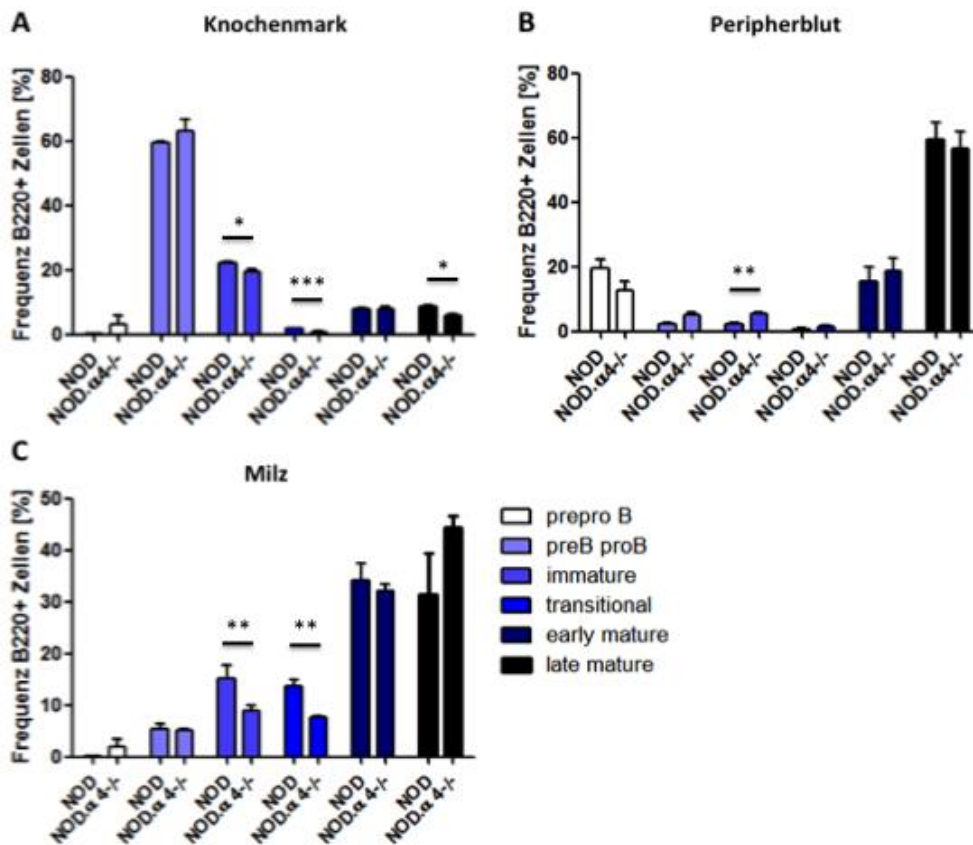
Anhand der B220-Expression kann zwischen  $B220^{dim}$  und  $B220^{high}$ -Zellen unterschieden werden und somit der relative Anteil unreifer B-Zellen bestimmt werden.<sup>84</sup> In Abbildung 30 sind die relativen Anteile unreifer B-Zellen in Knochenmark, Peripherblut und Milz dargestellt. Der relative Anteil unreifer B-Zellen ( $B220^{dim}$ ) an der Gesamt-B-Zelllinie im Knochenmark zeigt sich in der  $NOD.\alpha4^{-/-}$  Maus mit  $65,3\pm 1,9\%$  gegenüber der NOD Maus mit einem Anteil von  $59,7\pm 0,8\%$  leicht erhöht ( $p = 0,04$ ). Ein ähnlicher Trend zeigt sich im Peripherblut, erreicht aber hier keine statistische Signifikanz ( $30,6\pm 6,7\%$  vs.

19,1±2,5%, p=0,19). Der relative Anteil unreifer B-Zellen in der Milz zeigt keine Abhängigkeit vom  $\alpha 4$ -Status und liegt jeweils bei etwa 20%.



**Abbildung 30** Relativer Anteil unreifer B-Zellen an B220+ Zellen der NOD (n=4) und NOD.alpha4-/- (n=5) Mäuse in Knochenmark, Peripherblut und Milz.

In Abbildung 31. sind die erfassten Entwicklungsstadien der B-Zell-Reifung abgebildet. Durch den Einsatz mehrerer Antikörper ist es möglich, die verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien genauer zu differenzieren. Anhand dieser Methode zeigt sich im Knochenmark der NOD.alpha4-/- Maus eine verminderte Frequenz unreifer B-Zellen ( $CD43^-CD24^+IgM^{dim}IgD^-$ , nicht zu verwechseln mit der  $B220^{dim}$  Population nach Montecino-Rodriguez et al, 2006) von  $16,2\pm 0,5\%$  zu  $18\pm 0,4\%$  ( $p = 0,03$ ), transitionaler B-Zellen von  $0,7\pm 0,03\%$  zu  $1,4\pm 0,08\%$  ( $p < 0,001$ ) und B-Zellen im späten Reifestadium von  $4,9\pm 0,5\%$  zu  $7,0\pm 0,5\%$  ( $p = 0,02$ ) im Vergleich zur NOD Kontrollmaus. Im Peripherblut zeigt sich eine erhöhte Frequenz unreifer B-Zellen mit  $4,9\pm 0,4\%$  zu  $2,1\pm 0,2\%$  ( $p = 0,001$ ) in der NOD Maus, in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass mit Natalizumab (medizinischer anti-funktionaler  $\alpha 4$ -Antikörper) behandelte Multiple Sklerose-Patienten erhöhte Konzentrationen zirkulierender unreifer B-Zellen haben, was  $\alpha 4$  als Retentionsfaktor für unreife B-Zellen im Knochenmark identifiziert.<sup>87</sup> In der Milz zeigt die NOD.alpha4-/- Maus gegenüber der NOD Maus eine leicht verminderte Frequenz von unreifen B-Zellen mit  $7,6\pm 0,6\%$  vs.  $10,8\pm 0,3\%$  ( $p=0,003$ ) und transitionalen B-Zellen  $6,5\pm 0,3\%$  vs.  $10,0\pm 0,6\%$  ( $p < 0,001$ ).

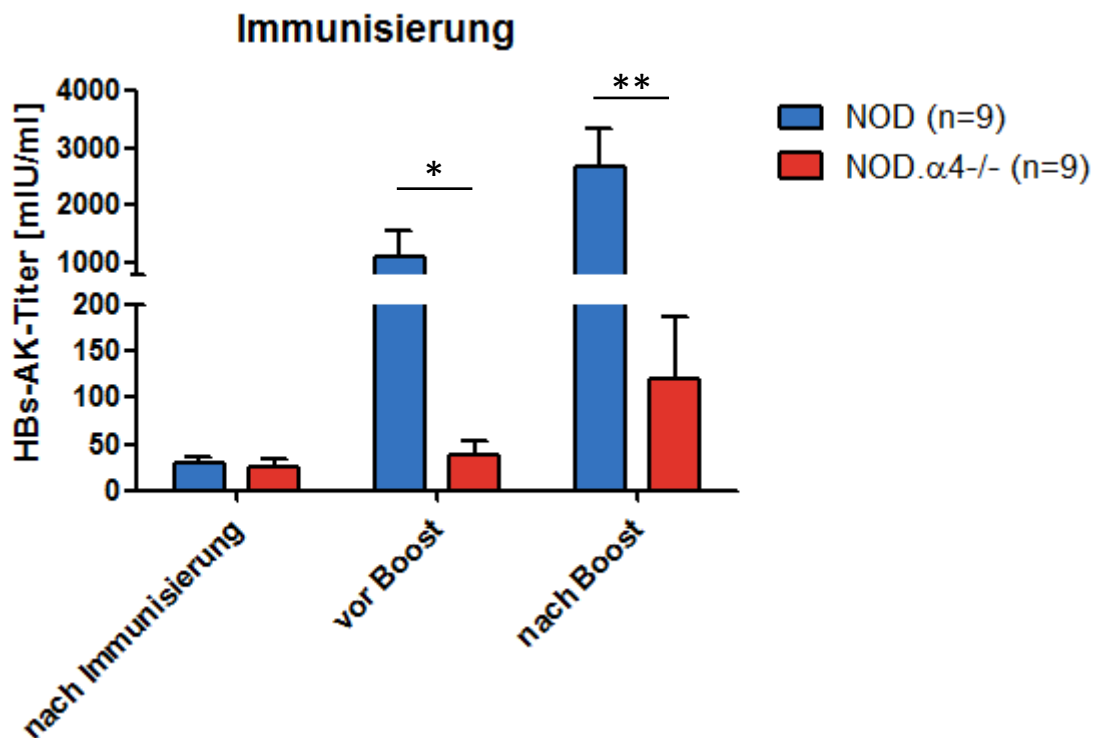


**Abbildung 31. B-Zell-Reifung.** Frequenz der verschiedenen Entwicklungsstufen an allen B220+ Zellen in NOD(n=4) und NOD.α4-/- (n=5) Weibchen in verschiedenen Kompartimenten (**A:** Knochenmark, **B:** Peripherblut, **C:** Milz). (MW± SEM; Asterisken indizieren statistische Signifikanz mit einem  $\beta$ -Fehler von \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005.)

### 3.5.2. Impfantwort: Primär- und Sekundärimmunisierung

Zur Untersuchung der Funktionalität der B-Zellen wurden die Mäuse mit humanem rekombinanten Hepatitis B Impfstoff behandelt. Hierzu erfolgte eine intramuskuläre Injektion einmal wöchentlich über drei Wochen mit 10% der bei Menschen üblichen Impfdosis. Eine Woche nach der dritten Behandlung erfolgte eine Blutentnahme und schließlich die Gewinnung von Plasma zur Bestimmung des Anti-HBs-Titers (s. Abbildung 32). Nach der primären Immunisierung konnte eine vergleichbare spezifische Immunantwort in beiden Kohorten festgestellt werden. 12 Wochen nach der primären Immunisierung erfolgte eine weitere intramuskuläre Injektion derselben Dosis zur Überprüfung der Ausbildung von B-Gedächtniszellen und deren Funktionalität. Je eine Woche vor und nach dieser Injektion erfolgten weitere Blutentnahmen und

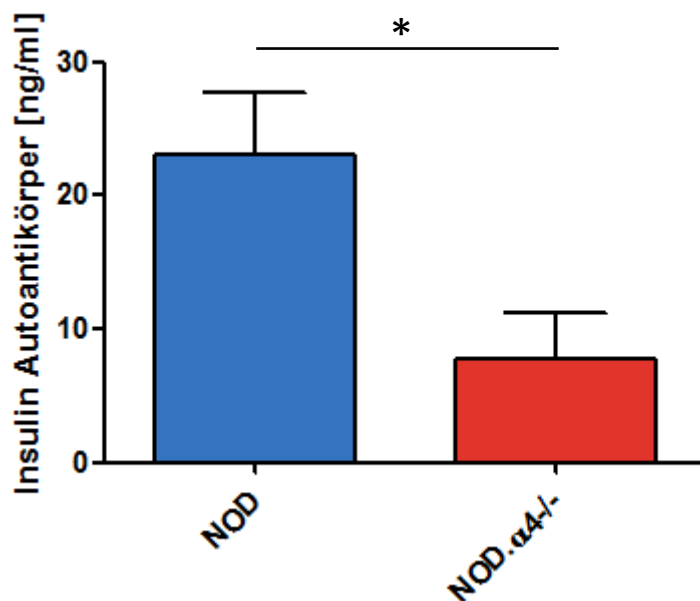
Titermessungen. Hier zeigt sich bei den NOD Mäusen schon eine Woche vor erneuter Immunisierung („Boost“) eine deutliche Erhöhung des Anti-HBs-Titers um mehr als das Dreißigfache des Ausgangswertes ( $1126 \pm 430$  mIU/ml) während eine Erhöhung des Titers bei den NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäusen ( $39 \pm 15$  mIU/ml) nicht beobachtet werden kann ( $p = 0,04$ ). Nach Boost steigen die Titer in den NOD Mäusen auf einen Wert von  $2680 \pm 666$  mIU/ml und in den NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäusen auf  $121 \pm 66$  mIU/ml ( $p = 0,0015$ ). NOD. $\alpha 4^{-/-}$  haben demnach eine grundsätzlich kompetente, quantitativ jedoch attenuierte humorale Immunfunktion, was die Beobachtung zu den Inselzellantikörpern (s. Abbildung 33) relevant komplementiert.



**Abbildung 32 Humorale Immunantwort gegenüber einem für Induktion einer B-Zell-Antwort optimierten Impfstoff.** Weibliche Mäuse,  $\alpha 4$ -kompetent oder  $-$ defizient, wurden mit dem klinisch relevanten rekombinanten HBsAG-Impfstoff EngerixB intramuskulär wöchentlich für 3 Wochen (Primärimmunisierung) sowie noch einmal nach 12 Wochen (Sekundärimmunisierung oder Boost) immunisiert. Anti-HBs Titer wurden unmittelbar nach Ende der Primärimmunisierungsserie, sowie eine Woche vor und eine Woche nach Gabe des EngerixB Boosts bestimmt. (n=9 Mäuse/Gruppe; MW  $\pm$ SEM; Asterisken indizieren statistische Signifikanz mit einem  $\beta$ -Fehler von  $*p < 0.05$  bzw.  $**p < 0.01$ ).

### 3.5.3. Insulin-Autoantikörper

NOD Mäuse produzieren Antikörper gegen mehr als ein Dutzend inselzellspezifische Antigene, die allerdings sehr variabel zu detektieren sind.<sup>21</sup> In dieser Arbeit wurden die Titer von Insulin Autoantikörpern (IAA) untersucht, da diese Methode zum einen für die NOD Maus etabliert ist und zum anderen diese Autoantikörper schon früh detektierbar sind.<sup>88</sup> Hierzu wurde zwischen 8. und 12. Lebenswoche Plasma von je 7 NOD und NOD.α4<sup>-/-</sup> Mäusen gewonnen und diese durch einen Sandwich-ELISA untersucht. Hierbei zeigt sich ein IAA-Titer von 38,74±4,7 ng/ml in der NOD Kohorte, 23,4±3,5 ng/ml in der NOD.α4<sup>-/-</sup> Kohorte und 15,7±3,7 ng/ml in 9 C57Bl/6 Mäusen als biologische Negativkontrolle (unspezifischer Hintergrund). Nach Subtraktion des Durchschnitts-Titers der Negativkontrolle ergibt sich ein spezifischer IAA-Titer von 21,3±4,7 ng/ml für die NOD Kohorte und von 5,4±3,5 ng/ml in der NOD.α4<sup>-/-</sup> Kohorte (p = 0,02; Abb. 33).



**Abbildung 33. Insulin-Autoantikörper.** Zur Bestimmung der Insulin-Antikörpertiter wurden Blutentnahmen zur Plasmagewinnung von unbehandelten α4-kompetenten oder –defizienten NOD Mäusen durchgeführt. Dargestellt sind die IAA-Titer (ng/ml) in weiblichen 8-12 Wochen alten NOD und NOD.α4<sup>-/-</sup> Mäusen nach Subtraktion des Mittelwerts der C57Bl/6-Negativkontrolle (MW± SEM, jeweils n=7, p=0,022).

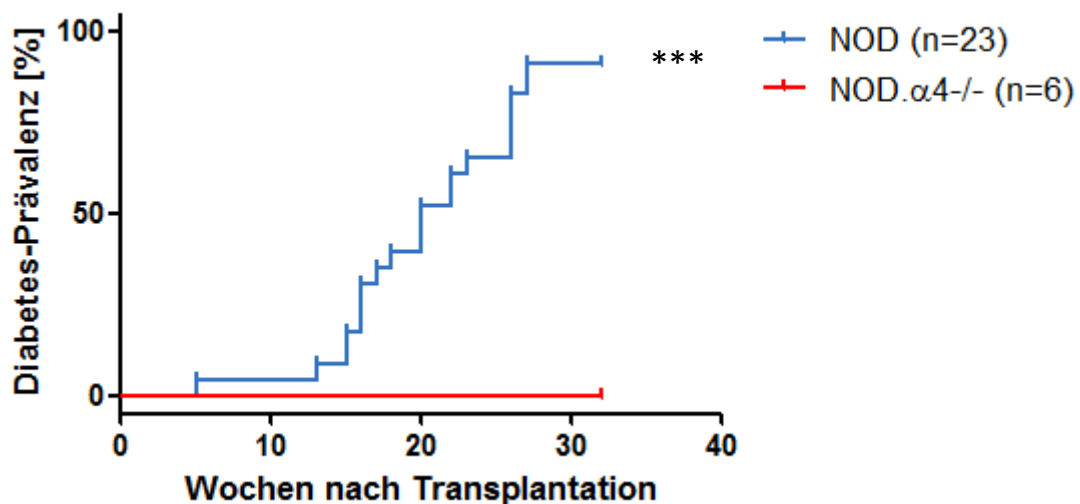
### 3.6. Sekundärprävention



In Kapitel 3.1. konnte gezeigt werden, dass  $\alpha 4$ -inkompetente NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse vor Diabetes geschützt sind. Inwiefern ein kompletter Verlust des  $\alpha 4$  Integrins auf Leukozyten zu einem späteren Zeitpunkt, an dem schon eine beginnende Insulinitis vorhanden ist, den Progress der Erkrankung unterbinden kann, sollte durch Transplantation prädiabetischer Empfänger mit NOD oder NOD $\alpha 4^{-/-}$  Knochenmark überprüft werden.

Bekanntermaßen besitzen  $\alpha 4$ -negative Stammzellen einen Knochenmarkshomingdefekt und eine entsprechend kompromittierte Repopulierungskapazität.<sup>53;54</sup> In einem Pilotversuch konnte beobachtet werden, dass eine Bestrahlung mit 9.5 Gy und eine anschließende Injektion von  $2 \times 10^6$  NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Knochenmarkszellen zu einer endogenen Rekonstitution des NOD Knochenmarks und der Entstehung einer gemischten hämatopoetischen Chimäre führte (nicht gezeigt). Um dies zu vermeiden, wurde die Bestrahlungsdosis auf 10.5 Gy erhöht und im Falle der Transplantation von  $\alpha 4$ -inkompetenten Knochenmarkszellen eine Zellzahl von  $10 \times 10^6$  gewählt. Insgesamt wurden 29 NOD Mäuse im Alter von 8-12 Wochen, einem Zeitpunkt an dem von einer beginnenden Insulinitis bei allen Empfängern auszugehen ist (Oulghazi *et al. Cells* 2020), mit einer Bestrahlungsdosis von 10.5 Gy behandelt. Daraufhin erhielten 23 dieser Mäuse  $2 \times 10^6$   $\alpha 4$ -kompetente Knochenmarkszellen und 6 Mäuse  $10 \times 10^6$   $\alpha 4$ -inkompetente Knochenmarkszellen. Die Knochenmarkszellen stammten in beiden Fällen von 3 Spendern, um die Spendervariabilität zu minimieren.

Abbildung 34 zeigt die Diabetes-Prävalenz der 29 Empfänger über einen Beobachtungszeitraum von 32 Wochen nach Knochenmarktransplantation. Während die 23 Empfänger von NOD-Knochenmark in vergleichbarem Maße (91% nach 40 Lebenswochen bei leicht verzögerter Kinetik) Diabetes entwickelten, erkrankte keiner der Empfänger von NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Knochenmark innerhalb des Beobachtungszeitraums ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 34 Sekundärprävention durch Knochenmark-Transplantation.** Da die  $\alpha 4$ -Defizienz NOD Weibchen vor Diabetes schützt, sollte durch die Sekundärprävention untersucht werden, ob prädiabetische 8-12 Wochen alte NOD Weibchen durch eine Knochenmark-Transplantation mit  $\alpha 4$ -defizienten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) kurativ behandelt werden können. Dargestellt ist die Diabetes-Prävalenz von 29 8-12 Wochen alten NOD-Empfängern, die nach 10.5 Gy Bestrahlung entweder  $2 \times 10^6$  NOD-Knochenmarkzellen oder  $10 \times 10^6$  NOD. $\alpha 4$ -/-Knochenmarkzellen erhalten haben. Der Beobachtungszeitraum nach Transplantation betrug 32 Wochen ( $p < 0,0001$ ).

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte die Rolle des  $\alpha 4$ -Integrins in der Pathophysiologie des Autoimmundiabetes erstmals anhand einer NOD. $\alpha 4$ -/- Maus untersucht werden. Unsere Daten demonstrieren auf deutlichste Weise die dominante Rolle des  $\alpha 4$ -Integrins in der Entstehung des Autoimmundiabetes. So hat keine der 19 untersuchten NOD. $\alpha 4$ -/- Mäuse im Laufe der ersten 40 Lebenswochen eine Hyperglykämie oder eine Insulitis gezeigt, bei einer zu erwartenden Inzidenz von etwa 80%. Grundsätzlich hatten die publizierten Daten zur antikörpervermittelten  $\alpha 4$ -Blockade eine präventive Wirkung der  $\alpha 4$ -Ablation erwarten lassen, wenn auch die Stärke des Effekts den von Antikörpern weit übersteigt: Kommajosyula et al. konnten durch eine ab dem 7. Lebenstag beginnende vierwöchige Gabe von anti- $\alpha 4$  (PS/2) eine Reduktion der Diabetes-Inzidenz von 71% auf 33% erreichen, während eine Kombination sieben verschiedener anti-CAM Antikörper (anti- $\alpha 4$ , anti- $\alpha 4\beta 7$  anti- $\beta 2$ , anti- $\beta 7$  und ihrer Liganden anti-MAdCAM-1, anti-VCAM-1 und anti-ICAM-1) zu einer Reduktion der Inzidenz auf 17% führte.<sup>63</sup> Ein späterer Beginn einer anti- $\alpha 4$  oder anti-CAM

Kombinationstherapie ab dem 70. Lebenstag führte interessanterweise zu einem schlechteren Ansprechen mit einem Inzidenzanstieg auf 50% und 100% zwischen Tag 94 und Tag 250. Die alleinige  $\alpha 4$ -Blockade konnte also mit dem Inzidenzanstieg auf 50% eine gewisse Wirkung beibehalten. Yang et al. führten histologische Untersuchungen an NOD Mäusen durch, welche ab der 5. Lebenswoche für 7 Wochen mit Antikörpern gegen  $\alpha 4$  (R1-2) oder L-Selectin (Mel-14) behandelt wurden. Hier zeigte sich in der mit R1-2 behandelten Kohorte eine vollständige Abwesenheit von Leukozyteninfiltraten der Langerhans-Inseln, während in der mit Mel-14 behandelten Kohorte bloß eine Reduktion der Insulitis-Schwere beobachtet wurde. Die Splenozyten dieser behandelten Mäuse wurden anschließend *in vitro* dahingehend untersucht, ob sie auf Inselzellantigene reagieren und diese als Autoantigene wahrnehmen. Der gemessene Proliferationsindex der drei behandelten Kohorten (PBS, R1-2, Mel-14) auf die untersuchten Autoantigene (GAD67, GAD65, Peripherin, CPH und HSP65) unterschied sich nicht signifikant, sodass die Autoren dies dahingehend deuteten, dass eine  $\alpha 4$ -Blockade nicht zu einer abgeschwächten Sensibilisierung gegenüber Autoantigenen führt.<sup>61</sup> Dies steht in Einklang mit unseren Daten zu der Abwesenheit von Insulitis sowie der quantitativ verminderten, jedoch eindeutig nachweisbaren autoreaktiven CD8+ T-Zellen und Insulin-Autoantikörpern in der NOD. $\alpha 4$ -/- Maus. Die hier gezeigten Daten aus dem genetischen Modell der  $\alpha 4$ -Insuffizienz beantworten jedoch eine Reihe von Fragen, die mit  $\alpha 4$ -blockierenden Antikörpern nicht beantwortet werden konnten. Unser Mausmodell ist von der Entstehung des ersten Lymphozyten bereits kontinuierlich und effizient  $\alpha 4$ -insuffizient. Weder stellt sich die Frage nach möglicherweise unzureichender oder nicht kontinuierlicher  $\alpha 4$ -Insuffizienz, d.h. Fragen der Pharmakokinetik und -dynamik der Antikörper, noch nach etwaigen direkten Effekten der  $\alpha 4$ -Antikörper auf Lymphozyten, wie direkte Zytotoxizität, Opsonierung, etc. Es ist aus den publizierten Arbeiten nicht erkennbar, dass die Mäuse einen  $\alpha 4$ -Blockade-Phänotyp mit Leuko-/Lymphozytose hatten und nicht etwa eine antikörpervermittelte Leuko-/Lymphopenie.<sup>60;61;63</sup> Das Antikörper-Modell bleibt außerdem die Antwort schuldig, ob  $\alpha 4$ -Defizienz vor Sensibilisierung gegen Autoantigene schützt. Unsere Daten zeigen erstmals, dass das nur bedingt der Fall zu sein scheint: Zwar sind Inselzell-autoreaktive T-Zellen in ihrer Frequenz bei  $\alpha 4$ -/- Mäusen

vermindert im Vergleich zu wildtypischen NOD Mäusen, jedoch ist eine gewisse Frequenz auch bei  $\alpha 4^{-/-}$  Mäusen sicher nachweisbar. Da  $\alpha 4^{-/-}$  Lymphozyten das (Pankreas-)Gewebe nicht infiltrieren können, möchten wir bezüglich des Ortes des Kontakts zwischen Autoantigenen und Lymphozyt das Pankreas als maximal unwahrscheinlich ausschließen. Dass in Ermangelung einer Insulinitis und des sich hieraus ergebenden positiven Proliferationssignals die Frequenz, möglicherweise auch die Diversität der anti-Inselzell-T-Zellen vermindert sein soll, ist unmittelbar nachvollziehbar. Inselzell-reaktive Autoantikörper, trotz ihrer nicht abschließend geklärten Rolle für die Diabetogenität, haben wir ebenfalls untersucht, können welche nachweisen, in allerdings erheblich niedrigeren Titern als bei wildtypischen NOD. Während die zelluläre Immunität der  $\alpha 4^{-/-}$  defizienten Maus bereits breit charakterisiert ist, war die humorale Immunität bisher wenig betrachtet worden. Um zu prüfen, ob sich die attenuierte humorale Antwort der  $\alpha 4^{-/-}$  Maus auf Autoantigene (oder sogar: auf Inselzellautoantigene) beschränkt, führten wir intramuskuläre Impfversuche durch, die prinzipiell dasselbe Ergebnis erbringen: Antikörperplasmaspiegel der  $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse waren denen der NOD Mäuse nach primärer Immunisierung nicht relevant verschieden. Die Sensibilisierung, auch die Boosterung, gelingt, jedoch auf quantitativ sehr niedrigem Niveau. Dass der Autoimmundiabetes der NOD Maus durch Transfer von Splenozyten (prä)diabetischer Spender auf die MHC-isogene, jedoch Lymphozyten-freie NOD.scid sicher und mit kürzester Latenz übertragen werden kann, ist gut dokumentiert. Im Rahmen eines adoptiven Transfers von Splenozyten diabetischer Spender konnte Baron *et al.* feststellen, dass eine vorige *in vitro* Behandlung der Zellen mit anti- $\alpha 4$  (LPAM-1) zu einer Reduktion der Diabetes Inzidenz zuvor bestrahlter NOD.scid Mäuse von 100 auf 70% zur Folge hatte. Eine weitere viermalige Behandlung (an Tag 0, 3, 6, 9 nach Transfer) der Empfänger des adoptiven Transfers führte zu einer Reduktion der Inzidenz auf 10% nach dem Beobachtungszeitraum von 40 Tagen.<sup>60</sup> Yang *et al.* führten eine tägliche anti- $\alpha 4$  (R1-2) Therapie nach adoptivem Transfer durch und konnten hierdurch alle (n=5) Empfänger vor der Diabetes-Entwicklung schützen.<sup>62</sup> Uniyal *et al.* konnten 1998 zeigen, dass im Modell des Cyclophosphamid-induzierten Diabetes eine anschließende zweimalige Gabe einer gegen  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  gerichteten Antikörper Therapie mit einer Verminderung der Insulinitis einhergeht. Hierbei wurde jedoch schon 48

Stunden nach letzter Gabe der histologische Nachweis einer Aggravation der Insulitis festgestellt.<sup>64</sup> Dies verdeutlicht die 2015 von Magnuson *et al.* festgestellte Dynamik der Leukozyteninfiltration mit konstantem Zell-Turnover der Langerhans–Inseln und macht dementsprechend eine kontinuierliche, möglichst frühe anti-Integrin Therapie notwendig, um die Funktion der Langerhans-Inseln auf Dauer zu gewährleisten.<sup>89</sup> In Zusammenschau dieser Daten fällt auf, dass eine kürzere Therapiedauer oder ein späterer Therapiebeginn zu einer deutlich schlechteren Protektion vor Autoimmundiabetes im Sinne des histologischen Nachweises einer progredienten Insulitis führt. Unsere histologischen Daten zeigen einen durch die embryonale Ablation bewirkten unbegrenzten, vollständigen Schutz der Langerhans-Inseln der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus. Unser genetisches Modell ermöglichte erstmals die Untersuchung der Rolle von  $\alpha 4$ -kompetenten T-Zell-Subtypen für die Diabetesentstehung in Anwesenheit aller anderen T-Zell-Subtypen, nämlich indem wir  $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger verwenden konnten. Transfer von diabetogenen  $\alpha 4$ -kompetenten Splenozyten in junge NOD-Empfänger führte, wie beschrieben, mit sehr kurzer Latenz und 100%iger Penetranz zu einem rasch progredienten Diabetes. Auch die für spontanen Autoimmundiabetes resistente  $\alpha 4^{-/-}$ .NOD Maus entwickelte als Empfängerin diabetogener T-Zellen mit 100%iger Penetranz Diabetes, jedoch war die Latenz deutlich länger. Wir postulieren, dass die in den wildtypischen (derzeit noch) nicht-diabetischen Empfängern infundierten T-Zellen vom entzündeten Pankreas angezogen werden, während das läsionsfreie Pankreas der  $\alpha 4^{-/-}$ .NOD Maus erst mit einiger Verzögerung von diabetogenen T-Zellen infiltriert wird. Adoptiver Transfer von diabetogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in wild-typische respektive NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse hingegen führte nur in den wildtypischen, nicht aber in NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäusen zur Entstehung eines Diabetes, d.h. die  $\alpha 4$ -Kompetenz der (endogenen) CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die von den CD4<sup>+</sup> co-rekrutiert werden, ist offenbar kritisch für die Kommunikation mit diabetogenen Helferzellen und die Zerstörung der Inselzellen.

Während die Daten zur  $\alpha 4$ -vermittelten Protektion vor T1D in der NOD Maus zumindest qualitativ eindeutig waren, zeigte sich bezüglich der von 1986 erstmals beschriebene Sialitis der NOD Maus bisher kein eindeutiges Bild.<sup>90</sup> Während Brando *et al.* 2000 eine verminderte Infiltration nach nicht-selektiver  $\alpha 4\beta 1^{-/-}$ ,  $\alpha 4\beta 7^{-/-}$  und  $\alpha 5\beta 1$ -Blockade durch das Gift EC3 von *Echis carinatus*

*suchoreki* zeigt, konnten Yang *et al.* keinen Einfluss auf die Sialitis-Inzidenz durch anti- $\alpha 4$  Behandlung beobachten.<sup>62;91</sup> Eine Gabe von Antikörpern gegen  $\alpha 4$  oder L-Selectin schien nach bisherigem Stand des Wissens nur die Schwere der Sialitis zu beeinflussen: Während für 4 Wochen mit PBS behandelte neugeborene NOD Mäuse einen Sialitis-Score von 2 (Range 0-4) aufwiesen, zeigten mit Mel-14 (anti-L-Selectin) oder R1-2 (anti- $\alpha 4$ ) behandelte NOD Mäuse einen diskret attenuierten Sialitis-Score von 1,2 oder 1,5. Genau wie im Falle der Insulinitis, zeigt sich auch in den Leukozyteninfiltraten in *Gll. Submandibulares* ein heterogenes Bild mit vorwiegend T-Zellen, aber auch B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Unsere Daten implizieren eindeutig eine übergeordnete Rolle des  $\alpha 4$ -Integrins in der Entstehung der Sialitis im NOD Modell. So konnte in keiner der entnommenen *Gll. Submandibulares* ein Infiltrationsherd gesehen werden, während die gleichaltrigen NOD-Kontrolltiere eine mittlere Anzahl von 19 Infiltrationsherden pro histologischem Schnitt aufweisen. Neben der Betrachtung der Histologie sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig, um abzuklären, ob die Abwesenheit der Sialitis auch mit einem verminderten spezifischen Autoantikörper-Titer und/oder autoreaktiven T-Zellen einhergeht. Hierzu wäre eine Bestimmung der Autoantikörper ANA, anti-Ro, anti-SSA und/oder ein Proliferationsassay mit Speicheldrüsen-Antigenen sinnvoll.<sup>92;93</sup>

In der letzten Dekade häuften sich Studien zu dem Einfluss der Darmflora auf den Autoimmundiabetes, sowohl bei der NOD Maus als auch beim Menschen. Die Zusammensetzung des Mikrobioms unterliegt einer Homöostase.<sup>94</sup> Gleichzeitig unterliegt sie aber auch multiplen exogenen Einflüssen, beispielweise der Art der Entbindung, der Ernährung, der Antibiotikaeinnahme, oder dem pH-Wert des Trinkwassers.<sup>95</sup> Speziell für die NOD-Maus wurde bereits eine Vielzahl von assoziativen Studien von Mikrobiom und Diabetes durchgeführt, die kausal zu interpretieren versucht worden war.<sup>68;69;76</sup> Änderungen der Mikrobiota durch Antibiotika werden, auch für die NOD-Maus, reproduzierbar gezeigt, was auch wenig überrascht. Dann allerdings berichten die Gruppen wahlweise protektive und präzipitierende Effekte der Mikrobiota auf die Diabetesentstehung. In der NOD Maus führte eine postnatal bis zur 40. Lebenswoche durchgeführte Behandlung mit Vancomycin zu einer veränderten Zusammensetzung der Darmflora (vermehrt *Escherichia*, *Lactobacillus* und

*Sutterella* Genera und verminderte *Clostridiales*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* und *Rikenellaceae* Familien) und einer damit einhergehenden Abnahme der regulatorischen T-Zellen in der intestinalen *lamina propria* und letztlich einem Diabetes-Inzidenzanstieg.<sup>96</sup> Auch eine Antibiotika-Therapie mit Metronidazol, Neomycin und Polymyxin von schwangeren NOD Mäusen führte zu einem Diabetes-Inzidenzanstieg des Nachwuchses mit einhergehender verminderter  $\alpha$ -Diversität des Mikrobioms.<sup>97</sup> Hu *et al.* beschrieben 2015 andererseits nach dreiwöchiger Gabe von Neomycin/Polymyxin/Streptomycin eine altersabhängige Inzidenzabnahme.<sup>98</sup> Die Dreifachtherapie führte zu einem signifikant verschobenen Gram+/Gram- Verhältnis des Mikrobioms, welches selbst 6 Monate nach Behandlungsende noch nachweisbar war. In den NPS-Kohorten konnten weniger *Proteobacteriae* und deutlich vermehrte *Lachnospiraceae* als auch *Coriobacteriaceae* nachgewiesen werden. Während die Inzidenzabnahme bei einer Therapie während der Schwangerschaft am deutlichsten war, war die Wirkung bei einer Therapie 3 Wochen alter NOD Weibchen mit einer Inzidenzabnahme von 80% auf 55% geringer ausgeprägt. In Anbetracht der teilweise widersprüchlichen Literatur ist man noch weit davon entfernt, die Rolle des Mikrobioms in der T1D Pathogenese vollständig zu verstehen. Zu den oben genannten Studien zu Antibiotika-Therapien von NOD Mäusen muss erwähnt werden, dass Antibiotika wie Vancomycin und Streptomycin mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Nephro-, Neuro- und Ototoxizität einhergehen. Da in unserer Studie keine medikamentöse Intervention erfolgte, können hier derartige unerwünschte Einflüsse ausgeschlossen werden. Durch die vom Diabetes geschützte NOD. $\alpha 4$ -/- Maus ist es uns möglich gewesen, das Mikrobiom dieser gesunden Maus mit dem NOD-Mikrobiom zu vergleichen. Mäuse wurden unabhängig vom Genotyp gemeinsam gehalten. Aufgrund der speziestypischen Coprophagie wäre eine Angleichung der Mikroflora über alle Genotypen zu erwarten. Wäre eine bestimmte Mikrobiota für die Diabetes-Entstehung ursächlich (und nicht Konsequenz des Diabetes) und bei den diabetischen Mäusen zu finden, sollten alle Mäuse, wiederum unabhängig vom Genotyp, ebenfalls diese Flora und ebenfalls Diabetes haben. Dies ist jedoch nicht, was wir beobachtet haben: Unsere Daten zeigen eine weitgehend übereinstimmende  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität des Mikrobioms in NOD. $\alpha 4$ -/- und prädiabetischer NOD Kohorte (d.h. kein

Effekt der  $\alpha 4$ -Kompetenz auf die Mikrobiota), während diabetische NOD Mäuse eine deutlich verminderte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität bis hin zum vollständigen Verlust bestimmter Erreger aufweisen (Diabetes verändert Wirtsfaktoren im Darm und daraus sich ergebend die Mikrobiota). Hervorzuheben ist hierbei vor allem die Abnahme oder der vollständige Verlust von *Ruminococci*, *Candidatus Saccharimonas* und *Prevotellaceae*, sowie eine Zunahme von *Bacteroides*. Erwähnenswert ist hierbei insbesondere die Abnahme von *Prevotellaceae* in unserer Diabetes-Kohorte, die nach Vancomycin-Gabe durch Candon *et al.* mit einem Inzidenzanstieg einherging und für die eine kausale Rolle impliziert wurde. Unsere Daten können diese Kausalität sicher ausschließen, vielmehr verstehen wir die veränderte Mikrobiota als „Signatur“ einer diabetischen Stoffwechsellage. Vergleiche unserer Mikrobiota mit der von diabetischen Mäusen aus anderer Ätiologie werden in Kürze begonnen.

Der hämatopoetische Phänotyp der  $\alpha 4^{-/-}$  Maus wurde erstmals 2003 von Scott *et al.* beschrieben.<sup>53</sup> Hierbei zeigte sich eine Akkumulation von Progenitorzellen in Peripherblut und Milz. Zudem zeichneten sich die auf dem C57Bl/6 Hintergrund generierten  $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse durch ein eingeschränktes short-term Engraftment und Knochenmark Homing aus, während das Homing in die Milz unauffällig war. In einer Folgestudie zeigte sich zudem ein kompetitiver Nachteil der  $\alpha 4^{-/-}$  gegenüber wildtypischen hämatopoetischen Stammzellen in Transplantationsexperimenten.<sup>54</sup> Abschließend wurden diese Daten von den Autoren so interpretiert, dass das  $\alpha 4$ -Integrin wichtiger für Situationen des regenerativen Stresses sei als für das Aufrechterhalten der hämatopoetischen Homöostase. In der untersuchten NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus konnten im *steady state* keine signifikanten Unterschiede im Immunphänotyp festgestellt werden. Bei genauerer Betrachtung der T-Zell-Subtypen konnte jedoch eine verminderte Frequenz CD8<sup>+</sup> Zellen in Peripherblut und Milz zu Gunsten der Frequenz von CD4<sup>+</sup> Zellen in selbigen Kompartimenten festgestellt werden. Innerhalb der zytotoxischen und T-Helfer Zellen konnte eine sowohl im Peripherblut als auch der Milz bestehende Verminderung der naiven CD3<sup>+</sup> Zellen zu Gunsten der Effektor-Zellen festgestellt werden.

Mit der Generierung erster funktionierender Peptid-MHC-Komplexe wurde es erstmals möglich, antigenspezifische T-Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen. 2011 gelang es Crawford *et al.*, einen spezifischen Insulin-B



Peptid-MHC-Komplex zu generieren und hiermit autoreaktive CD4+ Zellen in den Pankreata wildtypischer NOD Mäuse zu bestimmen.<sup>73</sup> Während Crawford *et al.* diese spezifische Multimer-TCR-Bindung in 0.5% der CD4+ positiven Zellen beschrieben haben, zeigen unsere Daten nach Abzug der internen Negativkontrolle etwa 1.3% Insulin B spezifische MHCII-Multimer+/CD4+ Zellen. Hierbei sei zu erwähnen, dass Crawford *et al.* CD4+ Zellen aus den Pankreata 8 Wochen alter NOD Weibchen untersucht hat, während unsere Peripherblutproben von bereits 20 Wochen alten NOD Weibchen stammen. Die beobachtete Größenordnung ist somit absolut plausibel. In dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der autoreaktiven MHCII-Multimer+/CD4+ Zellen in unseren Kohorten darzustellen. Dies könnte sowohl am Mangel von Positivkontrollen als auch etablierter Protokolle liegen – das Reagens wurde von der Diabetes-Core des NIH der USA zur Erprobung und Protokollentwicklung zur Verfügung gestellt. Während Crawford *et al.* das experimentelle MHCII Reagenz entwickelt und erstbeschrieben haben, ist das in dieser Arbeit genutzte MHCI Reagenz qualitätsgesichert und kommerziell erhältlich. Das gegen das Inselzellantigen IGRP gerichtete CD8+ Zellen detektierende MHCI Reagenz konnte sowohl in Peripherblut als auch in der Milz der NOD Kontrollkohorte konsistent eine Population in der Frequenz von 1-2% der CD8+ Zellen detektieren. Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten in der Detektion Insulin-B spezifischer CD4+ Zellen durch das MHCII Reagenz, konnten mit Hilfe der beiden Reagenzien autoreaktive CD4+ und CD8+ Zellen im Peripherblut detektiert werden. Für beide Zellspezies schien die Frequenz der inselzellspezifischen T-Zellen in den NOD. $\alpha$ 4-/- Mäusen vermindert, im Falle der CD8+ Zellen sogar statistisch signifikant vermindert. Dies unterstützt den Befund der abgeschwächten Sensibilisierung von T-Zellen im  $\alpha$ 4-/- Asthma Modell, welches zuvor durch Banerjee *et al.* beschrieben wurde.<sup>56</sup> Zur weiteren Sicherung dieser Befunde wäre es sinnvoll, weitere antigenspezifische T-Zellen in NOD-Kontrollkohorte und der generierten NOD. $\alpha$ 4-/- Maus zu untersuchen. So könnte es sein, dass in unserem Modell einige, aber nicht alle inselzellspezifische T-Zellen aufgrund der  $\alpha$ 4-Inkompetenz entstehen können.<sup>77</sup> Um funktionell nachzuweisen, ob eine Sensibilisierung der  $\alpha$ 4-/- Leukozyten gegenüber Inselzellantigene besteht, erfolgte ein *in vitro* Zytokin-Assay. Hierzu wurden Splenozyten von NOD. $\alpha$ 4-/- und NOD Kontrollmäusen mit dem

inselzellspezifischen IGRP-Peptid inkubiert und anschließend die intrazelluläre IFN $\gamma$ -Sekretion durchflusszytometrisch bestimmt. Die Wahl auf das IGRP-Peptid fiel, nachdem wir beobachten konnten, wie dieses verlässlich von CD8+ Zellen erkannt wird (s. Abb. 20). Hierbei konnte sich jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der intrazellulären IFN $\gamma$ -Sekretion nach Inkubation mit inselzellspezifischem Antigen (IGRP) zeigen. Die Schwächen dieser Methode sind einerseits die Untersuchung nur eines von vielen Inselzellantigenen und zweitens, dass es sich hierbei um die einzige Methode dieser Arbeit handelt, in der Splenozyten 16 Wochen alter männlicher Mäuse verwendet wurden. Die hormonell bedingt verminderte Diabetes-Inzidenz könnte sich auf die Sensibilisierung gegenüber inselzellspezifischen Antigenen auswirken und somit das Ergebnis beeinflussen.<sup>36</sup> Außerdem gibt es für dieses Experiment keine sichere Positivkontrolle und es können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob das Peptid prozessiert und präsentiert wurde. Diese Schwächen könnten durch Untersuchung verschiedener Inselzellantigene wie GAD65 oder ZnT8, als auch der Verwendung von prädiabetischen Weibchen im Alter von 12-20 Wochen minimiert werden. Zudem erscheint eine durch PMA- und Ionomycin-Inkubation hervorgerufene IFN $\gamma$ -Sekretion einer Frequenz von 5-6% der CD4+ Zellen als im Vergleich zu anderen *in vitro* Studien vermindert.<sup>99</sup> Dies kann am Modell der NOD Maus oder einer zu schwachen Dosis der Stimulanzen sprechen und sollte vor einer weiteren Untersuchung genauer hinterfragt werden. Zusammenfassend sprechen diese Daten für eine verminderte Sensibilisierung der NOD. $\alpha$ 4-/- Maus gegenüber Inselzellantigenen. Es sind jedoch Untersuchungen mit primär weiblichen prädiabetischen Mäusen und weiteren inselzellspezifischen Antigenen notwendig, um den genauen Status der Sensibilisierung gegenüber sezernierten und zytosolischen Inselzellantigenen zu bestimmen. Zudem sollten weitere Untersuchungen geplant werden, um den T-Zell Phänotyp der NOD. $\alpha$ 4-/- Maus mit dem einhergehenden erhöhten CD4/CD8 Verhältnis, als auch der auffälligen Verschiebung hin zu einem erhöhten Effektor/Naive T-Zell Phänotyp zu untersuchen. Hierbei wäre es interessant zu klären, ob und wenn ja, warum ein Ausbleiben von Leukozyteninfiltrationen und Entzündung als auch diabetischer Stoffwechsellage zu einem erhöhten Effektor/Naive T-Zell

Phänotyp führt. Die bisherigen Daten des  $\alpha 4^{-/-}$  Genotyps in anderen Mausmodellen haben diesen Befund nicht beschrieben.

Der Autoimmundiabetes der NOD Maus ist eine primär T-Zell vermittelte Erkrankung. 1994 konnten Christianson *et al.* zeigen, dass ein Transfer mit CD3+ Zellen oder aufgereinigten CD4+ Zellen aus den Milzen diabetischer NOD-Donor Diabetes in NOD.*scid* Mäusen auslösen kann.<sup>41</sup> Das heißt, die etwaige humorale anti-Inselzellantigen-Reaktivität ist funktionell irrelevant oder zumindest redundant. Im Kontrast dazu führt ein Transfer aufgereinigter CD8+ Zellen in NOD.*scid* Empfängern nicht zur Erkrankung. Yagi *et al.* konnten 2 Jahre zuvor schon im Modell der athymischen *nude* NOD Maus zeigen, dass ein Transfer aufgereinigter CD8+ Zellen weder zur Hyperglykämie noch zur Insulinitis führte, während ein Transfer aufgereinigter CD4+ Zellen eine milde Insulinitis ohne einen IDDM auslöste.<sup>100</sup> In beiden Studien wurden monoklonale Antikörper gegen CD4 oder CD8 verabreicht, um einen möglich selektiven Transfer sicherzustellen. Im Falle des sequenziellen Transfers von CD4+ und anschließend CD8+ Transfer führte diese Kombination zur Erkrankung aller Empfänger. Rohane *et al.* nutzten 1995 erstmals Inselzell-infiltrierende Leukozyten für einen adoptiven Transfer in NOD.*scid* Mäuse und lösten hiermit etwa nach 25 Tagen einen symptomatischen Diabetes mellitus aus.<sup>101</sup> Bei Ko-Transfer von Splenozyten oder CD4+ Zellen aber nicht CD8+ Zellen, führte dies zu einem verspäteten Erkrankungszeitpunkt und weist somit die immunregulatorischen Einflüsse von CD4+ Zellen hin. Mittlerweile sind ein gutes Dutzend inselzellspezifische Antigene bekannt, die in der Lage sind, T-Zellen der NOD Maus gegenüber inselzellspezifischen Antigenen zu sensibilisieren.<sup>21</sup> Zudem scheinen CD4+ Zellen meist mehrere und im Falle von GAD65 sogar 15 Epitope zu erkennen.<sup>78</sup> Eine Gemeinsamkeit all dieser adoptiven Transferexperimente von Splenozyten und auch letztlich der im weiteren Verlauf diskutierten adoptiven Transferexperimente Pankreas-infiltrierender oder prospektiv isolierter Inselzellantigen-spezifischer T-Zellen ist, dass die Empfänger den NOD Mäusen bezüglich der Histokompatibilität isogen sind, die NOD.*scid* Empfänger auch die Mehrzahl der Diabetes Susceptibility Loci besitzen, sie aber keinerlei Lymphozyten besitzen, also einen schweren kombinierten Immundefekt haben. Die Konsequenzen hieraus sind komplex: Adoptiv transferierte T-Zellen können sich ohne Vorbehandlung der NOD.*scid*

Empfänger dramatisch expandieren, da keine Konkurrenz mit endogenen T-Zellen besteht und endogene T-Zell-stimulierende sezernierte Faktoren infolge fehlenden Feedbacks spontan, d.h. schon ohne radiologische Lymphodepletion, aufreguliert sind. Auf supportive T-Zell Spezies angewiesene T-Zell Funktionen können in diesem Modell in Ermangelung von Empfänger-T-Zellen nicht ausgebildet werden. Überraschend ist, dass die sehr geringe zytotoxische Aktivität von CD4+ T-Zellen ausreichen soll, ohne Unterstützung von CD8+ T-Zellen mit rascher Kinetik das Pankreas der NOD.scid Mäuse zu zerstören. In der Tat waren spätere Untersuchungen mit rigoroseren Selektionstechnologien nur bedingt in der Lage, eine Diabetesentstehung allein durch Transfer hochreiner diabetogener CD4+ T-Zellen zu bestätigen (58% Inzidenz nach CD4+ Splenozyten Transfer und anti-CD8 Therapie). Durch einen CD3+ Transfer nach subletaler Bestrahlung, wie in dieser Arbeit durchgeführt, bewirkt man eine Reduktion endogener  $\alpha 4^{-/-}$  Leukozyten in der immunologischen Nische. Durch Transfer von T-Zellen diabetischer Spender (und somit gegen verschiedene Inselzellantigene gerichteter, polyklonaler T-Zellen) in eine zuvor durch Bestrahlung freigeräumte immunologische Nische wird die Proliferation der Spender T-Zellen angeregt. Die hier durchgeführten Untersuchungen sind in dieser Art in nicht-genetischen Modellen nicht vorstellbar: Wir können, da die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse ein nachweislich (wenn auch mit gewissen qualitativen und quantitativen Defiziten) funktionelles adaptives Immunsystem besitzen, durch Transfer isolierter T-Zell Spezies diabetischer Spender in NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger eruieren, welche T-Zellen kritisch auf  $\alpha 4$ -Integrin angewiesen sind, um diabetogen zu wirken. Für CD3+ Zellen und CD4+ Zellen haben wir bereits gezeigt, dass NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäuse nach Transfer der ersteren, wenn auch mit signifikant verlängerter Latenz im Vergleich zu NOD-Empfängern, alle einen Diabetes entwickeln, während NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger von CD4+ T-Zellen weiter gegenüber T1D gefeit sind, obwohl diese Zellen nach Transfer in nicht-diabetische NOD Mäuse innerhalb kürzester Zeit zu letalem Diabetes führen. Im Gegenteil zu NOD.scid und athymischen NOD Maus besitzt die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus ein funktionelles Immunsystem. Dies erklärt wahrscheinlich den verspäteten mittleren Erkrankungszeitpunkt an Tag 30 nach CD3+ Transfer während dies bei den NOD-Kontrollempfänger schon an Tag 18 eintritt. Im Vergleich zu den bisher genutzten Modellen stellt dies eine neue Möglichkeit

dar, den Einfluss eines bis auf den  $\alpha 4^{-/-}$  Phänotyp gleichen Immunmilieus auf die Potenz von diabetogenen CD4<sup>+</sup> Zellen zu untersuchen. In Kontrast zu den aufgeführten Erstarbeiten bezüglich fraktionierter T-Zell Transfers in der NOD Maus zur Untersuchung der Beteiligung von verschiedenen T-Zell Subtypen zeigen unsere Ergebnisse, dass der alleinige Transfer diabetischer CD4<sup>+</sup> Zellen in die NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus nicht ausreichend ist, um Diabetes auszulösen. Dies könnte damit zu tun haben, dass das endogene Immunsystem der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Maus einen regulatorischen Effekt auf die transferierten CD4<sup>+</sup> Zellen ausübt. Studien von von Herrath *et al.* unterstützen diese Hypothese durch ihre Beobachtungen bezüglich einer initialen regulatorischen Balance in der NOD Maus, welche erst im späteren Verlauf der Insulitis und Sialitis in einer Imbalance und letztendlich fulminanten Erkrankungsbeginn hineinmündet.<sup>12</sup> In unseren NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Mäusen dasselbe Experiment auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchzuführen, ist trotz der negativen Ergebnisse in T-Zell-freien Empfängern von sehr großem Interesse, auch aus klinischer Warte. Es wurde nämlich klinische Evidenz vorgelegt, dass ein Transfer von antigenspezifischen (hier: CMV pp65-spezifischen) CD8<sup>+</sup> T-Zellen in extrem lymphopene und ziemlich sicher selber für antigenspezifische T-Zellen negative Patienten mit maximaler Zuverlässigkeit zu einer antigenspezifischen Expansion und Kontrolle der Viruskrankheit führte.<sup>102</sup> Analog wäre nicht auszuschließen, dass  $\alpha 4^{-/-}$ CD4<sup>+</sup> in der Lage sein könnten, den CD8<sup>+</sup> T-Zellen T-Zell-Hilfe zu leisten. Diese Experimente dauern derzeit an. In unserer Studie mangelt es derzeit noch an histologischen Auswertungen vor allem der gesunden NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Empfänger, um zu beantworten, ob es nach Transfer diabetogener CD4<sup>+</sup> Zellen zu einer subklinischen Insulitis kommt. Durch ihre  $\alpha 4$ -Expression können Spender-Lymphozyten in unserem Modell auch noch Wochen nach dem Transfer erkannt und durchflusszytometrisch analysiert werden. An dieser Stelle wäre interessant zu erfahren, ob und inwiefern sich die Spender-Lymphozyten nach dem Transfer in vivo verändern und welchen Einfluss Spender- und Empfänger-Lymphozyten aufeinander haben. Schließlich unterstreichen die in dieser Arbeit erfolgten T-Zell Transfers das diabetogene Potenzial von CD3<sup>+</sup> Zellen aus diabetischen NOD Spendern und deuten auf immunregulatorische Funktionen des endogenen NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Immunsystems hin.

Nachdem die Ergebnisse aus dem CD3+ T-Zell Transfer einen deutlich verzögerten Erkrankungsbeginn in den Empfängerkohorten zeigten, sollte eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, den verspäteten Erkrankungsbeginn bildmorphologisch zu untersuchen und darzustellen. Dies sollte durch Biolumineszenz Imaging in Kooperation mit Prof. Ullrich aus der Pädiatrie der Uniklinik Frankfurt verwirklicht werden. Nach Optimierung der Transfektion und Transduktion von primären T-Zellen der NOD Spender, erfolgte ein *ex vivo* Imaging von Pankreata, Speicheldrüsen und Milzen der Empfänger zur Darstellung der Spender-Lymphozyten in diesen Organen. Die ersten Ergebnisse unterstreichen den  $\alpha 4^{-/-}$  Phänotyp in der Milz im Sinne einer erhöhten Radiance durch Homing-Vorteil von  $\alpha 4$ -kompetenten Spender-Lymphozyten in der NOD. $\alpha 4^{-/-}$  Milz. Die ersten Daten zu den Pankreata und Speicheldrüsen zeigen einen prominenten Fokus in der Speicheldrüse eines wildtypischen Empfängers, entsprechend der aufgestellten Hypothese nach Beobachtung unserer CD3+ Transfers. Nebenbefundlich zeigte sich nach Transfer transduzierter diabetischer CD3+ T-Zellen eine transiente Hyperglykämie aller Empfänger mit Blutzucker-Werten von 150-250 mg/dl. Zu diesem Zeitpunkt fand die erste *ex vivo* BLI statt. In den kommenden Tagen stellte sich in beiden Kohorten wieder eine Normoglykämie ein, sodass die zweite Aufnahme bei zwei zu diesem Zeitpunkt normoglykämischen Mäusen stattfand. Um auszuschließen, dass der Grund hierfür nicht in der *in vitro* Expansion und Transduktion der CD3+ Zellen liegt („exhausted T cells“), sollte vor einer BLI einer größeren Kohorte ein erneuter adoptiver Transfer von transduzierten T-Zellen mehrerer diabetischer Spender durchgeführt werden, um das diabetogene Potenzial nach *in vitro* Behandlung sicherzustellen. Abschließend ist festzuhalten, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, ein Protokoll zur Transfektion und Transduktion primärer NOD T-Zellen und anschließendem adoptivem T-Zell Transfer sowie Biolumineszenz-Imaging zu etablieren, um die Kinetik der Entstehung von Leukozyteninfiltraten zu untersuchen.

Scott *et al.* konnten 2003 anhand der C57BL/6. $\alpha 4^{-/-}$  Maus zeigen, dass diese nach cre-Rekombinase-induzierter Ablation eine etwa 10-fach erhöhte Anzahl an Progenitorzellen im Peripherblut aufweisen als wildtypische C57BL/6 Mäuse.<sup>53</sup> Bönig *et al.* konnten 2008 vergleichbare Wirkungen bei mit

Natalizumab behandelten MS-Patienten feststellen.<sup>87</sup> Diese hatten bereits einen Tag nach erster Injektion des  $\alpha 4$ -Antikörpers eine etwa 6-fach über das Normale erhöhte Anzahl an Progenitorzellen im Blut. Eine erhöhte Anzahl an Progenitorzellen und/oder HSCs ist also eine typische Folge der  $\alpha 4$ -Blockade. Bei der initialen Untersuchung des humoralen Immunsystems der NOD. $\alpha 4$ -/- Maus zeigt sich ausschließlich im Knochenmark eine reduzierte Frequenz an B-Zell Vorläufer. Diese wurden anhand der verminderten Expression von B220 analog dem Protokoll von Montecino-Rodriguez identifiziert.<sup>84</sup> Zur Bestimmung, welche der B-Zell Vorläufer genau reduziert vorliegen, erfolgte eine multiparametrische durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Reifungsstadien. Hierbei zeigte sich im Einklang mit den Vorbefunden eine verminderte Frequenz der unreifen, transitionalen aber auch des späten Reifestadiums der B-Zellen im Knochenmark im Sinne eines diskreten Retentionsdefekts. Im Peripherblut zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Frequenz unreifer B-Zellen und in der Milz eine verminderte Frequenz der unreifen und transitionalen B-Zellen. Ähnlich wie durch Scott *et al.* beschrieben, zeigt die NOD. $\alpha 4$ -/- Maus eine erhöhte Anzahl an Progenitorzellen im Peripherblut (Daten nicht gezeigt). Der Mangel des  $\alpha 4$ -Integrins auf der Oberfläche der B-Zellen führt also zu einer defizienten Retention im Knochenmark mit exzessiven Vorläuferzellzahlen im Peripherblut mit einhergehender Verschiebung der im Wildtyp beschriebenen Verteilung der Reifestufen. Eine verfrühte Migration von Vorläufer-B-Zellen könnte der Grund der verminderten Entwicklung in reife B-Zellen sein. Außerdem wäre denkbar, dass durch den  $\alpha 4$ -Mangel der Leukozyten durchaus auch  $\alpha 4$ -abhängige outside-in Signale fehlen, um eine geordnete und quantitativ normale B-Zell-Reifung zu gewährleisten. Zudem ist ein Cosignaling von  $\alpha 4$  und CXCR4 beschrieben.<sup>103;104</sup> Eine  $\alpha 4$ -Blockade könnte hierbei das CXCR4 Signaling beeinflussen, welches vor allem für B-Zell-Vorstufen von essenzieller Bedeutung ist.<sup>83</sup>

Neben der durchflusszytometrischen Phänotypisierung erfolgte eine Immunisierungsstudie mit einem für Menschen zugelassenen Hepatitis B Impfstoff. Der Vorteil dieses Reagenz ist vielseitig: Es ist ein Peptid, das für eine gute Immunreaktionsinduktion optimiert und garantiert für den murinen Organismus fremd ist. Zudem gibt es ein hochspezifisches, sensitives und

quantitatives Messgerät für diese Immunreaktion. In dieser Studie zeigte sich eine quantitativ vergleichbare primäre Immunisierung (s. Abb. 32) nach dreimaliger Behandlung. Jedoch zeigte sich nach 3 Monaten ein um das 20-fache signifikant verminderter Impftiter in der NOD. $\alpha$ 4-/- Maus und nach sekundärer Immunisierung ein deutlich weniger ausgeprägter Anstieg des Impftiters im Sinne einer Booster-Reaktion. Zusammenfassend zeigt sich eine vergleichbare primäre Immunisierung und ein sekundärer Immunisierungsdefekt. Banerjee *et al.*, welche die bisher einzigen immunologischen Untersuchungen in der  $\alpha$ 4-/- Maus erhoben haben, konnten nach Transplantation von  $\alpha$ 4-/- Knochenmark in Rag2-/- Mäuse verminderte IgM und IgE Spiegel bei normalwertigem IgG, sowie ein abgeschwächtes Homing in den Thymus und ins darmassoziierte Lymphgewebe feststellen.<sup>55;56</sup> Während die Autoren annahmen, dass  $\alpha$ 4 für die initiale humorale Immunantwort relevanter als für die Ausbildung einer langfristigen Immunisierung sei, sprechen unsere Daten eine andere Sprache. Durch die dreimalige Messung und einen Beobachtungszeitraum von über 3 Monaten sowie die genaue Messfähigkeit des ARCHITECT, können wir mit großer Sicherheit sagen, dass die  $\alpha$ 4-/- Maus einen quantitativen sekundären Immunisierungsdefekt aufweisen. Um schließlich zu untersuchen, ob die vor Diabetes geschützte NOD. $\alpha$ 4-/- Maus vergleichbare Autoantikörper-Titer produziert, erfolgte die Messung von Insulin-Autoantikörpern im Plasma der beiden Kohorten. Der hier genutzte Sandwich-ELISA hat einen außerordentlich hohen Reaktivitätshintergrund. Um diesen herausrechnen zu können, wurden Plasmen von diabetesresistenten C57Bl/6 Mäusen als Kontrollen mitgeführt. Der mittlere Messwert im Plasma dieser Mäuse wurde als Hintergrund subtrahiert. Hierbei zeigte sich für die NOD. $\alpha$ 4-/- Kohorte ein im Vergleich zu NOD Mäusen signifikant verminderter IAA-Titer nahe der Nachweisgrenze. Die beobachtete Differenz in der NOD. $\alpha$ 4-/- Kohorte lässt sich, was die absolute Stärke des Signals angeht, mit Daten aus der Literatur nicht bewerten, da in IAA-Studien stets Laborinterne Indices angegeben werden.<sup>21;105</sup> Somit deuten unsere Daten darauf hin, dass die NOD. $\alpha$ 4-/- Maus Antikörper gegen Inselzellantigene, jedoch reduzierte IAA-Titer produziert. Ob dies teilweise auch durch den Phänotyp der in der Immunisierungsstudie beobachteten generellen



quantitativen Immunisierungsdefekts begründet liegt, kann hier nicht ausgeschlossen werden.

Die kritische Rolle des  $\alpha 4$ -Integrins, insbesondere des  $\alpha 4$ -Integrins auf CD3+ T-Zellen, bei der Entstehung des T1D haben wir in unserem neuartigen Modell definitiv belegt. Bezüglich eines therapeutischen Ansatzes ist diese Information jedoch nicht unmittelbar nutzbar, da die Inzidenz des T1D zu niedrig ist, als dass eine generelle  $\alpha 4$ -Blockade bei allen Neugeborenen empfohlen werden könnte. Frühestens wäre so eine Therapie bei Identifikation hoch prädiktiver Risikoparameter zu erwägen; beim T1D könnte das beispielsweise eine Familienanamnese, ungünstige HLA-Konstellationen und Auftreten gewisser inselzellspezifischen Antikörper sein.<sup>20</sup> Noch günstiger wäre es, wenn man den Therapiebeginn bis unmittelbar nach Erstmanifestation verschieben könnte. Um dieses Szenario in unserem Modell abzubilden, hatten wir neben der NOD.TekCre $\alpha 4$  auch noch eine NOD.TamCre $\alpha 4$  Maus generiert. Leider war nach Einkreuzen des TamCre über 10 Generationen auf den NOD Hintergrund TamCre nicht mehr aktivierbar. Als Alternativmodell, weniger elegant und wenig subtil, prüften wir den sekundär-prophylaktischen Effekt der isogenen Knochenmarktransplantation auf die Diabetes-Prävalenz der NOD Maus. Hierzu gibt es Studien, die den Einfluss einer antikörpervermittelten Blockade von  $\alpha 4$  in der NOD Maus beschreiben (s. Kapitel 1.3.). Um dies in diesem Mausmodell definitiv zu untersuchen, wurden 8-12 Wochen alte NOD Mäuse letal bestrahlt und anschließend mit wildtypischem oder  $\alpha 4$ -/- Knochenmarkzellen transplantiert. Wildtypische Empfänger junger NOD-Knochenmarker nicht-diabetischer Spender erkrankten mit typischer Latenz und Frequenz, während Empfänger altersgematchten NOD. $\alpha 4$ -/- Knochenmarks, der genetischen Prädisposition der wildtypischen Empfänger zum Trotz, lebenslang vor Diabetes geschützt waren. Während die oben erwähnten Therapien alle einen Einfluss auf die Diabetesinzidenz mit den verschiedenen Dosen und Behandlungsräume zeigten, können wir den dominanten Einfluss der  $\alpha 4$ -Blockade auf die Diabetes-Prävalenz bestätigen und zeigen, dass eine vollständige Blockade zu einem sicheren Sistieren der Erkrankung führt. Diese Studie bekräftigt die Potenz der  $\alpha 4$ -Blockade als Sekundärprävention und unterstreicht die Wirkung einer antikörperbasierten Therapie im Menschen als mögliche Behandlung bei besonders schwierigen Verläufen.



## 5. Anhang

### Literaturverzeichnis

- (1) Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 2008;371:1777-1782.
- (2) Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabet Med* 2009;26:673-678.
- (3) Kukko M, Kimpimaki T, Korhonen S et al. Dynamics of diabetes-associated autoantibodies in young children with human leukocyte antigen-conferred risk of type 1 diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2712-2717.
- (4) Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB, Jr. et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. *JAMA* 2007;297:2716-2724.
- (5) Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 2000;23:1516-1526.
- (6) Vandewalle CL, Coeckelberghs MI, De Leeuw IH et al. Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetes Care* 1997;20:1556-1561.
- (7) Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009;373:2027-2033.
- (8) Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39:481-497.
- (9) Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314:1360-1368.
- (10) Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 2005;48:2221-2228.
- (11) Akirav E, Kushner JA, Herold KC. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes* 2008;57:2883-2888.
- (12) von HM, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol* 2007;7:988-994.
- (13) Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:69-89.

- (14) Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 2008;40:1399-1401.
- (15) Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 2009;360:1646-1654.
- (16) Pociot F, Akolkar B, Concannon P et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes* 2010;59:1561-1571.
- (17) Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 2009;361:2143-2152.
- (18) Bingley PJ. Clinical applications of diabetes antibody testing. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:25-33.
- (19) Knip M, Korhonen S, Kulmala P et al. Prediction of type 1 diabetes in the general population. *Diabetes Care* 2010;33:1206-1212.
- (20) Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem* 2011;57:168-175.
- (21) Pietropaolo M, Towns R, Eisenbarth GS. Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2.
- (22) Wilkin TJ. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* 2001;44:914-922.
- (23) Cooke A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? *Immunology* 2009;126:12-17.
- (24) von Herrath MG, Fujinami RS, Whitton JL. Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nat Rev Microbiol* 2003;1:151-157.
- (25) Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes* 2008;57:2555-2562.
- (26) Wasserfall C, Nead K, Mathews C, Atkinson MA. The threshold hypothesis: solving the equation of nurture vs nature in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011;54:2232-2236.
- (27) Gale EA. Congenital rubella: citation virus or viral cause of type 1 diabetes? *Diabetologia* 2008;51:1559-1566.
- (28) Jaidane H, Sauter P, Sane F, Goffard A, Gharbi J, Hober D. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Rev Med Virol* 2010;20:265-280.
- (29) Gerstein HC. Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* 1994;17:13-19.

- (30) Adler K, Mueller DB, Achenbach P et al. Insulin autoantibodies with high affinity to the bovine milk protein alpha casein. *Clin Exp Immunol* 2011;164:42-49.
- (31) Pozzilli P, Manfrini S, Crino A et al. Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 2005;37:680-683.
- (32) Bailey R, Cooper JD, Zeitels L et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* 2007;56:2616-2621.
- (33) Bogdanou D, Penna-Martinez M, Filmann N et al. T-lymphocyte and glycemic status after vitamin D treatment in type 1 diabetes: A randomized controlled trial with sequential crossover. *Diabetes Metab Res Rev* 2017;33.
- (34) Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G. Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes Care* 1999;22:1698-1702.
- (35) Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29:1-13.
- (36) Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Katagiri K. Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. *Jikken Dobutsu* 1981;30:137-140.
- (37) Diana J, Simoni Y, Furio L et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med* 2013;19:65-73.
- (38) Shoda LK, Young DL, Ramanujan S et al. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 2005;23:115-126.
- (39) Fujino-Kurihara H, Fujita H, Hakura A, Nonaka K, Tarui S. Morphological aspects on pancreatic islets of non-obese diabetic (NOD) mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985;49:107-120.
- (40) Leiter EH. The NOD Mouse: A Model for Analyzing the Interplay Between Heredity and Environment in Development of Autoimmune Disease. 35[1], 4-14. 1-1-1993. *ILAR Journal*.
- (41) Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 1993;42:44-55.
- (42) Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. 154[1], 180-191. 1-1-1995.
- (43) Park Y. Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77 Suppl 1:S110-S115.
- (44) Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD et al. Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J Clin Invest* 2006;116:3258-3265.

- (45) Wen L, Ley RE, Volchkov PY et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008;455:1109-1113.
- (46) Christen U, Bender C, von Herrath MG. Infection as a cause of type 1 diabetes? *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:417-423.
- (47) Baker RL, Wagner DH, Jr., Haskins K. CD40 on NOD CD4 T cells contributes to their activation and pathogenicity. *J Autoimmun* 2008;31:385-392.
- (48) Lee LF, Xu B, Michie SA et al. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15995-16000.
- (49) Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. *J Clin Invest* 1994;94:1722-1728.
- (50) Shishido S, Bonig H, Kim YM. Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Front Oncol* 2014;4:99.
- (51) Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 1995;128:1243-1253.
- (52) Liu S, Kiosses WB, Rose DM et al. A fragment of paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits alpha 4-mediated cell migration. *J Biol Chem* 2002;277:20887-20894.
- (53) Scott LM, Priestley GV, Papayannopoulou T. Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol Cell Biol* 2003;23:9349-9360.
- (54) Priestley GV, Scott LM, Ulyanova T, Papayannopoulou T. Lack of alpha4 integrin expression in stem cells restricts competitive function and self-renewal activity. *Blood* 2006;107:2959-2967.
- (55) Banerjee ER, Latchman YE, Jiang Y, Priestley GV, Papayannopoulou T. Distinct changes in adult lymphopoiesis in Rag2<sup>-/-</sup> mice fully reconstituted by alpha4-deficient adult bone marrow cells. *Exp Hematol* 2008;36:1004-1013.
- (56) Banerjee ER, Jiang Y, Henderson WR, Jr., Scott LM, Papayannopoulou T. Alpha4 and beta2 integrins have nonredundant roles for asthma development, but for optimal allergen sensitization only alpha4 is critical. *Exp Hematol* 2007;35:605-617.
- (57) Banerjee ER, Jiang Y, Henderson WR, Jr., Latchman Y, Papayannopoulou T. Absence of alpha 4 but not beta 2 integrins restrains development of chronic allergic asthma using mouse genetic models. *Exp Hematol* 2009;37:715-727.
- (58) Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354:899-910.
- (59) Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2013;369:711-721.

- (60) Baron JL, Reich EP, Visintin I, Janeway CA, Jr. The pathogenesis of adoptive murine autoimmune diabetes requires an interaction between alpha 4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 1994;93:1700-1708.
- (61) Yang XD, Michie SA, Tisch R, Karin N, Steinman L, McDevitt HO. A predominant role of integrin alpha 4 in the spontaneous development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12604-12608.
- (62) Yang XD, Michie SA, Tisch R, Karin N, Steinman L, McDevitt HO. Cell adhesion molecules: a selective therapeutic target for alleviation of IDDM. *J Autoimmun* 1994;7:859-864.
- (63) Kommajosyula S, Reddy S, Nitschke K, Kanwar JR, Karanam M, Krissansen GW. Leukocytes infiltrating the pancreatic islets of nonobese diabetic mice are transformed into inactive exiles by combinational anti-cell adhesion therapy . 70[4], 510-517. 1-10-2001. *Journal of Leukocyte Biology*.
- (64) Uniyal S, Boeters L, Chakrabarti S, Singh B, Chan BM. Leukocytes utilize both alpha4 and alpha5 integrins for intraislet infiltration in non-obese diabetic mice. *J Autoimmun* 1999;12:167-176.
- (65) Wagner J, Pfannenstiel V, Waldmann A et al. A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin (IL)-15 and IL-21 Improves Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma. *Front Immunol* 2017;8:676.
- (66) Trembleau S, Penna G, Gregori S, Gately MK, Adorini L. Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes. *Eur J Immunol* 1997;27:2330-2339.
- (67) Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nat Protoc* 2009;4:1649-1652.
- (68) Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12:154-167.
- (69) Giongo A, Gano KA, Crabb DB et al. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J* 2011;5:82-91.
- (70) Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016;13:581-583.
- (71) Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010;5:e9490.
- (72) Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* 2011;5:169-172.
- (73) Crawford F, Stadinski B, Jin N et al. Specificity and detection of insulin-reactive CD4+ T cells in type 1 diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16729-16734.

- (74) Jasinski JM, Eisenbarth GS. Insulin as a primary autoantigen for type 1A diabetes. *Clin Dev Immunol* 2005;12:181-186.
- (75) Abel T, El FE, Waern J et al. Specific gene delivery to liver sinusoidal and artery endothelial cells. *Blood* 2013;122:2030-2038.
- (76) de Goffau MC, Luopajarvi K, Knip M et al. Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without. *Diabetes* 2013;62:1238-1244.
- (77) Nakayama M, Abiru N, Moriyama H et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 2005;435:220-223.
- (78) Yang J, James EA, Sanda S, Greenbaum C, Kwok WW. CD4+ T cells recognize diverse epitopes within GAD65: implications for repertoire development and diabetes monitoring. *Immunology* 2013;138:269-279.
- (79) Barclay AN, Brown MH. Heterogeneity of interactions mediated by membrane glycoproteins of lymphocytes. *Biochem Soc Trans* 1997;25:224-228.
- (80) Janeway CA, Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992;10:645-674.
- (81) Massilamany C, Krishnan B, Reddy J. Major Histocompatibility Complex Class II Dextramers: New Tools for the Detection of antigen-Specific, CD4 T Cells in Basic and Clinical Research. *Scand J Immunol* 2015;82:399-408.
- (82) Crawford TQ, Jalbert E, Ndhlovu LC, Barbour JD. Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell subsets by flow cytometry. *Cytometry A* 2014;85:268-276.
- (83) Mandal M, Okoreeh MK, Kennedy DE et al. CXCR4 signaling directs Igk recombination and the molecular mechanisms of late B lymphopoiesis. *Nat Immunol* 2019;20:1393-1403.
- (84) Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 2006;7:293-301.
- (85) Allman D, Lindsley RC, DeMuth W, Rudd K, Shinton SA, Hardy RR. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* 2001;167:6834-6840.
- (86) Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991;173:1213-1225.
- (87) Bonig H, Wundes A, Chang KH, Lucas S, Papayannopoulou T. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood* 2008;111:3439-3441.
- (88) Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G et al. International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not



glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 2001;50:2451-2458.

- (89) Magnuson AM, Thurber GM, Kohler RH, Weissleder R, Mathis D, Benoist C. Population dynamics of islet-infiltrating cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:1511-1516.
- (90) Miyagawa J, Hanafusa T, Miyazaki A et al. Ultrastructural and immunocytochemical aspects of lymphocytic submandibulitis in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1986;51:215-225.
- (91) Brando C, Marcinkiewicz C, Goldman B, McLane MA, Niewiarowski S. EC3, a heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus*, inhibits human and murine alpha4 integrin and attenuates lymphocyte infiltration of Langerhans islets in pancreas and salivary glands in nonobese diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:413-417.
- (92) Silveira PA, Baxter AG. The NOD mouse as a model of SLE. *Autoimmunity* 2001;34:53-64.
- (93) Skarstein K, Wahren M, Zaura E, Hattori M, Jonsson R. Characterization of T cell receptor repertoire and anti-Ro/SSA autoantibodies in relation to sialadenitis of NOD mice. *Autoimmunity* 1995;22:9-16.
- (94) Zheng P, Li Z, Zhou Z. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes Metab Res Rev* 2018;34:e3043.
- (95) Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 2012;4:1095-1119.
- (96) Candon S, Perez-Arroyo A, Marquet C et al. Antibiotics in early life alter the gut microbiome and increase disease incidence in a spontaneous mouse model of autoimmune insulin-dependent diabetes. *PLoS One* 2015;10:e0125448.
- (97) Tormo-Badia N, Hakansson A, Vasudevan K, Molin G, Ahrne S, Cilio CM. Antibiotic treatment of pregnant non-obese diabetic mice leads to altered gut microbiota and intestinal immunological changes in the offspring. *Scand J Immunol* 2014;80:250-260.
- (98) Hu Y, Peng J, Tai N et al. Maternal Antibiotic Treatment Protects Offspring from Diabetes Development in Nonobese Diabetic Mice by Generation of Tolerogenic APCs. *J Immunol* 2015;195:4176-4184.
- (99) Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;159:197-207.
- (100) Yagi H, Matsumoto M, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M. Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol* 1992;22:2387-2393.
- (101) Rohane PW, Shimada A, Kim DT et al. Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice. *Diabetes* 1995;44:550-554.

- (102) Pfirrmann V, Oelsner S, Rettinger E et al. Cytomegalovirus-specific cytokine-induced killer cells: concurrent targeting of leukemia and cytomegalovirus. *Cytotherapy* 2015;17:1139-1151.
- (103) Bonig H, Watts KL, Chang KH, Kiem HP, Papayannopoulou T. Concurrent blockade of alpha4-integrin and CXCR4 in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Stem Cells* 2009;27:836-837.
- (104) Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 2005;24:4462-4471.
- (105) Robles DT, Eisenbarth GS, Dailey NJ, Peterson LB, Wicker LS. Insulin autoantibodies are associated with islet inflammation but not always related to diabetes progression in NOD congenic mice. *Diabetes* 2003;52:882-886.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Halvard Bönig möchte ich zu aller erst dafür danken mich so eng und freundschaftlich die letzten vier Jahre beraten und betreut zu haben. Dankbar bin ich zudem für die Bereitstellung dieser interessanten Fragestellung und der wissenschaftlichen Möglichkeiten in seinem Labor am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Goethe Universität. Danke, dass ich jederzeit in dein Büro kommen konnte, du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mich auch außerhalb der wissenschaftlichen Arbeit unterstützt hast.

Ein besonderer Dank gilt der ganzen Arbeitsgruppe Bönig für die freundliche und angenehme Atmosphäre und die Integration als fester Bestandteil dieser. Unvergessen bleibt die entgegengebrachte Unterstützung in die Einarbeitung neuer Methoden und den fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch, vor allem durch Dr. Eliza Wiercinska, Dr. Benjamin Tast, Elisabeth Ehrend, Dr. Peter Milanov, Dr. Soo-Zin Kim-Wanner und Sabine Harenkamp.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Dr. Benjamin Tast und Elisabeth Ehrend.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Evelyn Ullrich und Ihrer Arbeitsgruppe für die freundliche Unterstützung in der Umsetzung des Biolumineszenz Imagings sowie Trina A. Knotts, Ph.D., vom Mouse Metabolic Phenotyping Center der UC Davis für die angenehme und lehrreiche Kooperation im Rahmen unserer Mikrobiota-Studie.

Ganz besonders danke ich natürlich meiner Familie für die kontinuierliche Unterstützung, das Verständnis und die Möglichkeiten, die sie mir eröffneten, sowie meinen Freunden die mich jederzeit unterstützten.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Avicenna Studienwerk e.V. und dem BMBF.

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle des  $\alpha$ 4-Integrins in der Pathophysiologie des Autoimmundiabetes am Modell der spontan diabetischen NOD Maus“

am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen (Direktor: Prof. Dr. Erhard Seifried) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Halvard Bönig mit Unterstützung durch Eliza Wiercinska ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Salim Oulghazi, Sarah K. Wegner, Gabriele Spohn, Nina Müller, Sabine Harenkamp, Albrecht Stenzinger, Thalia Papayannopoulou, Halvard Bonig (2020) Adaptive immunity and pathogenesis of diabetes: Insights provided by the  $\alpha$ 4-integrin deficient NOD mouse, *Cells* (in press)

1,2,4,\*

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)