

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Zelluläre Immunreaktionen bei  
diabetischen INS<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen

von Isabella-Maria Giese  
aus Oranienburg

München 2020



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/en: Prof. Dr. Frank Ebel

Tag der Promotion: 25. Juli 2020



*Meinen Eltern*



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURTEIL .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Diabetes mellitus.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Klassifikation des Diabetes mellitus .....</b>	<b>4</b>
2.2.1	Diabetes mellitus Typ 1 .....	4
2.2.2	Diabetes mellitus Typ 2 .....	7
2.2.3	Monogene Diabetesformen .....	10
2.2.4	Mutationen des Insulingens.....	11
<b>2.3</b>	<b>Diabetes mellitus in der Tiermedizin .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>Tiermodelle in der translationalen Diabetes mellitus-Forschung .....</b>	<b>15</b>
2.4.1	Nagermodelle in der Diabetesforschung.....	17
2.4.2	Großtiermodelle in der Diabetesforschung .....	18
2.4.3	Schweinemodelle in der Diabetesforschung.....	19
<b>2.5</b>	<b>INS<sup>C94Y</sup> transgene Schweine als Diabetesmodell .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Metabolische Veränderungen von T-Zellen.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Probenmaterial .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolierung von PBMCs aus dem peripheren Blut mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation.....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Puffer und Lösungen .....	32

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2	Gewinnung der porzinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) .....	32
3.2.3	Zählung der isolierten Zellen .....	33
<b>3.3</b>	<b>Durchflusszytometrie und Analyse .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Puffer und Lösungen .....	34
3.3.2	Antikörper.....	35
3.3.3	Fluoreszenzfärbung von porzinen PBMCs .....	35
3.3.4	Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer .....	36
3.3.5	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten .....	37
3.3.6	Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten .....	38
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zum zellulären Metabolismus porziner PBMCs .....</b>	<b>39</b>
3.4.1	Puffer und Lösungen .....	39
3.4.2	Reagenzien: Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit.....	39
3.4.3	Messverfahren mittels Seahorse XFe24 Analyzer .....	40
3.4.4	Vorbereitungen der Messung.....	41
3.4.5	Simultane Messungen von OCR und ECAR .....	41
3.4.6	Auswertung der Messergebnisse.....	42
3.4.7	Statistische Auswertung .....	44
<b>3.5</b>	<b>Lymphozytenproliferation.....</b>	<b>45</b>
3.5.1	Puffer und Lösungen .....	45

## Inhaltsverzeichnis

---

3.5.2	<i>In vitro</i> Stimulation und radioaktive Markierung der porcinen Lymphozyten .....	45
3.5.3	Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten .....	46
<b>3.6</b>	<b>Magnetische Zellseparation.....</b>	<b>47</b>
3.6.1	Puffer und Materialien .....	47
3.6.2	Gewinnung von positiv selektierten porcinen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	48
<b>3.7</b>	<b>Massenspektrometrische Analyse mittels DIA LS-MS/MS .....</b>	<b>49</b>
3.7.1	FASP Verdau der Zellfraktionen .....	49
3.7.2	LC-MS/MS.....	52
3.7.3	Abgleich mit der Spektralbibliothek und quantitative Analyse.....	53
3.7.4	Statistische Auswertung der Proteinabundanzen.....	53
3.7.5	Visualisierung der proteomischen Datenanalyse .....	54
<b>3.8</b>	<b>Immunzytochemie.....</b>	<b>55</b>
3.8.1	Puffer und Antikörper.....	55
3.8.2	Immunzytochemische Färbung .....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Lymphozytenpopulationen in peripheren mononukleären Blutzellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine.....</b>	<b>57</b>
4.1.1	Periphere B- und T-Lymphozyten bei INS <sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen	57
4.1.2	Subpopulationen peripherer T-Lymphozyten bei INS <sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen .....	59

<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zum zellulären Metabolismus von peripheren Blutzellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine .....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Mitochondriale Respiration.....	65
4.2.2	Glykolytische Aktivität.....	69
<b>4.3</b>	<b>Polyklonale Stimulation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine.....</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>Untersuchungen zum zellulären Metabolismus von peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine .....</b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Proteomische Analyse von peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine mittels DIA LC-MS/MS .....</b>	<b>79</b>
4.5.1	Proteinprofile porziner peripherer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	79
4.5.2	Differentielle Proteinabundanzen bei peripheren CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus INS <sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen .....	79
4.5.3	Identifizierung von Kandidatenproteinen.....	81
<b>4.6</b>	<b>Verifikation des Kandidaten Annexin A1 .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>113</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>139</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
AGC	Automatic Gain Control
AnxA1	Annexin A1
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BanLec	<i>Musa paradisiaca</i> (banana) Lektin
Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
CD	Cluster of Differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
cpm	Einheit für die [3H]-Aktivität (engl. counts per minute)
CRISPR	gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen (engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DIA	datenunabhängige Akquisition
dl	Deziliter
DLA	canine Leukozytenantigene
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECAR	Extracellular Acidification Rate
EMS	equines metabolisches Syndrom
engl.	Abkürzung für englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting)
FASP	Art der Proteinaufbereitung für die Massenspektrometrie (engl. Filter-aided sample preparation)

## Abkürzungsverzeichnis

---

FCS	fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FDR	Falschpositivrate (engl. false discovery rate)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GCK	Glukokinase
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HbA <sub>1c</sub>	glykiertes Hämoglobin
HLA	humane Leukozytenantigene
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high-performance liquid chromatography)
ID	Innendurchmesser
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
INS-Gen	Insulin-Gen
KCNJ11	engl. Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KS	Kolmogorov-Smirnov Test
l	Liter
LC	Liquid-Chromatographie (engl. liquid chromatography)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie (engl. mass spectrometry/mass spectrometry)
LW	Lebenswoche
M	Molar
MACS	magnetische Zellseparation (engl. Magnetic Activated Cell Sorting)
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MIDY	Mutant INS gene-induced Diabetes of Youth
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmol	Millimol

## Abkürzungsverzeichnis

---

MODY	maturity-onset diabetes of the young
ms	Millisekunden
mtROS	mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies
Myl4	Myosin light chain 4
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NOD	engl. non-obese diabetic
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OCR	Oxygen Consumption Rate
p	Maß der statistischen Wahrscheinlichkeit
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration (H <sup>+</sup> )
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat 13-acetat
PWM	Pokeweed-Mitogen
rcf	Relative Zentrifugalkraft (engl. relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
SWC	engl. Swine Workshop Cluster
tg	transgen
Th	T-Helferzelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

## Abkürzungsverzeichnis

---

UPR	engl. unfolded protein response
WT	Wildtyp
ZDF	engl. Zucker Diabetic Fatty
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 3.1 Nüchtern-Blutglukose von Wildtyp- und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen im Alter von 4, 8 und 12 Lebenswochen .....	28
Abbildung 3.2 Triglyceridwerte von Wildtyp- und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen im Alter von 4, 8 und 12 Lebenswochen .....	29
Abbildung 3.3 Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse porziner PBMCs.....	38
Abbildung 3.4 Assayparameter zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) in PBMCs.....	43
Abbildung 3.5 Workflow des Proteinverbaus sowie der massenspektrometrischen Analyse .....	51
Abbildung 4.1 Prozentualer Anteil von B-Lymphozyten in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen .....	58
Abbildung 4.2 Prozentualer Anteil von T-Lymphozyten in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen .....	59
Abbildung 4.3 Prozentualer Anteil von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen .....	61
Abbildung 4.4 Prozentualer Anteil von CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen .....	62
Abbildung 4.5 Prozentualer Anteil von CD4 <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen .....	63
Abbildung 4.6 Prozentualer Anteil von SWC5 <sup>+</sup> Zellen in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen .....	64
Abbildung 4.7 Mitochondriale Respiration gemessen als Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) von PBMCs aus Wildtypen und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 4.LW .....	66

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 4.8 Mitochondriale Respiration gemessen als Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) von PBMCs aus Wildtypen und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 8.LW .....	67
Abbildung 4.9 Mitochondriale Respiration gemessen als Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) von PBMCs aus Wildtypen und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 12.LW .....	68
Abbildung 4.10 Glykolytische Aktivität gemessen als Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) von PBMCs aus Wildtypen und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 4.LW.....	70
Abbildung 4.11 Glykolytische Aktivität gemessen als Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) von PBMCs aus Wildtypen und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 8.LW.....	71
Abbildung 4.12 Glykolytische Aktivität gemessen als Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) von PBMCs aus Wildtypen und INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 12.LW .....	72
Abbildung 4.13 Polyklonale Stimulation von porzinen Lymphozyten aus dem peripheren Blut .....	75
Abbildung 4.14 Mitochondriale Respiration porziner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	77
Abbildung 4.15 Glykolytische Aktivität porziner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	78
Abbildung 4.16 Hierarchische Clusteranalyse signifikant unterschiedlich abundanter Proteine porziner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen gemessen mittels DIA LC-MS/MS.....	80
Abbildung 4.17 Differentielle Proteinabundanzen porziner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen gemessen mittels DIA LC-MS/MS .....	81
Abbildung 4.18 Verifikation der erhöhten Expression von AnxA1 in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von INS <sup>C94Y</sup> tg Schweinen.....	83
Abbildung 4.19 Expression von Annexin A1 bei porzinen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	85

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 4.20 Selektiv differentielle Expression von Annexin A1 bei porcinen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	87
---	----

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1 Massenspektrometrisch identifizierte, differentiell abundante Proteine bei CD4 <sup>+</sup> T-Zellen INS <sup>C94Y</sup> tg Schweine.....	82
--	----



## 1 EINLEITUNG

Im Jahr 2019 schätzte die International Diabetes Federation die Zahl der weltweiten Diabetes mellitus-Erkrankungen auf 463 Millionen und prognostizierte, dass bis zum Jahr 2030 nahezu 578 Millionen Menschen von Diabetes mellitus betroffen sein werden (Saeedi et al. 2019). Damit gehört Diabetes mellitus zu den wichtigsten nicht-übertragbaren Krankheiten und zu den großen Public-Health-Herausforderungen (Williams et al. 2020). Internationale Aktionspläne der Weltgesundheitsorganisation WHO sowie eine nationale, im Jahr 2015 in Deutschland etablierte, Diabetes-Surveillance des Robert-Koch-Instituts beweisen die große sozioökonomische Relevanz dieser Erkrankung. Die Krankheitslast für die betroffenen Personen ist insbesondere auf die diabetesspezifischen Folge- und Begleiterkrankungen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Nephropathien, Neuropathien und Retinopathien zurückzuführen (Harding et al. 2019). Die chronische Hyperglykämie beeinflusst darüber hinaus Immunfunktionen und den Immunstatus der Diabetes mellitus-Patienten (Donath, Dinarello, and Mandrup-Poulsen 2019). So weisen Personen mit Diabetes mellitus ein erhöhtes Infektionsrisiko und eine höhere Gesamtrate infektionsbezogener Todesfälle auf (Frydrych et al. 2018). Die Pathophysiologie beruht zum einen auf einem geringgradigen chronischen Entzündungsgeschehen und zum anderen auf veränderten Immunfunktionen durch die diabetogene Stoffwechsellage (Furman et al. 2019). Durch eine gestörte Glukosehomöostase konnten in zahlreichen Untersuchungen dysfunktionale Immunzellen charakterisiert werden (Fetterman et al. 2016; Myette-Cote et al. 2018; Kim et al. 2019). Die Erforschung der Immunmechanismen ist deshalb eine zentrale Aufgabe in der Diabetesforschung (Ilonen, Lempainen, and Veijola 2019). Schweine gelten als vielversprechende Diabetesmodelle, da sie große Ähnlichkeit zum Menschen hinsichtlich anatomischer, physiologischer und immunologischer Merkmale aufweisen (Renner et al. 2020). Ziel dieser Arbeit war es deshalb, periphere Immunzellen von INS<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen, die ein diabetisches Modell für eine monogenetische Diabetes mellitus-Erkrankung des Menschen darstellen, zu untersuchen und somit einen Beitrag zur Aufklärung von Immunfunktionen in einer diabetogenen Stoffwechsellage zu leisten.

---

## 2 LITERATURTEIL

### 2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus umfasst heterogene Stoffwechselstörungen, die aufgrund einer gestörten Insulinsekretion oder -wirkung oder einer Kombination aus beidem, auftreten und die durch eine chronische Hyperglykämie als Leitbefund gekennzeichnet sind (Petersmann et al. 2019). Der erhöhte Blutglukosespiegel und Imbalancen des Fettstoffwechsels gehen mit mikro- und makrovaskulären Komplikationen, Dysfunktionen und Störungen verschiedenerer Organtätigkeiten einher (Zheng, Ley, and Hu 2018). Diese können diabetische Retinopathien, Nephropathien, periphere Neuropathien, kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die koronare Herzerkrankung oder die periphere arterielle Verschlusskrankung sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen verursachen (Harding et al. 2019). In der Humanmedizin gelten als Diagnosekriterien für den Diabetes mellitus Gelegenheits-Plasmaglukosewerte von  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l), eine Nüchtern-Plasmaglukose von  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7,0$  mmol/l), ein HbA<sub>1c</sub>-Wert (glykiertes Hämoglobin) von  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol Hb) sowie venöse Plasmaglukosewerte von  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l) nach einem 2-stündigen oralen Glukosetoleranztest (Nauck et al. 2018). Die International Diabetes Federation schätzte in ihrem aktuellen Diabetes Atlas die Zahl der weltweit im Jahr 2019 an Diabetes mellitus erkrankten Personen auf 463 Millionen Menschen und prognostizierte weiterhin eine stark steigende Prävalenz in den kommenden Jahren (Saeedi et al. 2019). Darüber hinaus wurde die globale Prävalenz einer gestörten Glukosetoleranz auf 374 Millionen Menschen geschätzt (Saeedi et al. 2019). Gemeinsam mit abnormal erhöhter Nüchtern-Blutglukose im Bereich von 100-125 mg/dl (5,6mmol/l-6,9 mmol/l) oder einem HbA<sub>1c</sub>-Wert von 6,0-6,4% bilden sie die Kennzeichen eines Prädiabetes, welcher einen großen Risikofaktor für die Manifestation eines Diabetes mellitus darstellt (Punthakee, Goldenberg, and Katz 2018).

Zurzeit werden an Diabetes mellitus erkrankte Personen in Kategorien eingeteilt (Association 2020). Aus klinischer Sicht bestehen jedoch auch zahlreiche Schnittstellen zwischen den einzelnen Kategorien und zum Teil große Diversitäten innerhalb einer Kategorie, was eine patientenspezifische Therapie je nach

Krankheitsbild erforderlich macht (Leslie et al. 2016; Hoogwerf 2020). Nach der momentanen Einteilung sind neben dem immun-medierten Typ 1, der in der Folge einer autoimmunen Krankheitsentwicklung entsteht (DiMeglio, Evans-Molina, and Oram 2018), die meisten Patienten vom Diabetes mellitus Typ 2 betroffen, welcher durch eine Insulinresistenz und zahlreiche Komorbiditäten gekennzeichnet ist (Viigimaa et al. 2020). Eine diabetogene Stoffwechsellage, die erstmalig in der Schwangerschaft auftritt, wird als Gestationsdiabetes bezeichnet (Rosik et al. 2020). Nach der Entbindung stellt sich die Glukosehomöostase zumeist wieder ein (Rosik et al. 2020). Das Risiko für diese Frauen an einem Diabetes mellitus Typ 2 zukünftig zu erkranken ist um das 7-fache höher als für Frauen, bei denen die Glukosehomöostase während der Schwangerschaft nicht gestört war (Bellamy et al. 2009). Monogenetische Defekte können ebenfalls einen Diabetes mellitus bedingen (Lemelman, Letourneau, and Greeley 2018). Die Mutationen können dabei verschiedene Gene betreffen, wobei sich eine diabetogene Stoffwechsellage in den meisten Fällen bereits im frühen Kindesalter manifestiert (Lemelman, Letourneau, and Greeley 2018). Weitere Ursachen für die Entwicklung eines Diabetes mellitus können in Erkrankungen des exokrinen Pankreas wie zum Beispiel in einer Pankreatitis oder zystischen Fibrose liegen oder sie können durch Traumata, Pankreatektomien oder pankreatische Neoplasien bedingt sein (Bhattamisra et al. 2019). Endokrinopathien und eine pathophysiologische Synthese von Hormonen, die die Insulinwirkung antagonisieren, können ebenfalls einen Diabetes mellitus begünstigen (Barbot, Ceccato, and Scaroni 2018). Zusätzlich kann Diabetes mellitus medikamentös-chemisch (Liu, He, et al. 2018) oder durch Infektionen (Hosseininiasab Nodoushan and Nabavi 2019) verursacht werden und es kann in Zusammenhang stehen mit weiteren genetisch bedingten Erkrankungen wie dem Down-Syndrom, Klinefelter-Syndrom, Turner-Syndrom oder dem Wolfram-Syndrom (Feingold 2000).

## **2.2 Klassifikation des Diabetes mellitus**

### **2.2.1 Diabetes mellitus Typ 1**

Diabetes mellitus Typ 1 wird durch eine immun-medierte Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas hervorgerufen und ist in der Folge durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet (Ilonen, Lempainen, and Veijola 2019).

Die chronische Autoimmunerkrankung ist die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindesalter und seit Jahren kann weiterhin ein Anstieg der Inzidenzrate beobachtet werden (Xia et al. 2019). So stieg die Inzidenzrate von Diabetes mellitus Typ 1 in Europa im Kindes- und Jugendalter seit 1989 pro Jahr um 3,4% (Patterson et al. 2019). Trotz vieler assoziierter Faktoren, die in der Diabetesforschung in den letzten Jahren als Induktoren der Diabetes mellitus Typ 1-Erkrankung beschrieben wurden und diskutiert werden, ist weiterhin weder die genaue Ätiologie dieser Erkrankung bekannt, noch gibt es derzeit eine Erklärung für die in den letzten Jahrzehnten schnelle, weltweit ansteigende Inzidenz im jungen Kindes- und Jugendalter (Norris, Johnson, and Stene 2020). Es wird angenommen, dass ein Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren das autoimmune Geschehen induziert (Robertson and Rich 2018). Genomweite Assoziationsstudien haben bisher über 60 Genloci identifiziert, die mit der Entstehung der Erkrankung assoziiert werden und familiär gehäuft auftreten können (DiMeglio, Evans-Molina, and Oram 2018). Dabei wird den humanen Leukozytenantigenen (HLA) ein besonderer Einfluss auf das familiäre Risiko einer Diabetes mellitus Typ 1-Erkrankung zugeschrieben (Robertson and Rich 2018). HLA-Gene besitzen hinsichtlich der T-Zell-Selektion, Antigen-Präsentation und der Induktion verschiedener Immunantworten eine wichtige, regulative Funktion (Redondo, Steck, and Pugliese 2018). So wurden verschiedene HLA-Klasse II-Haplotypen entdeckt, die mit einem besonders hohen Diabetesrisiko und der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung assoziiert sind (Noble 2015). Eine hohe Inzidenzrate des Diabetes mellitus Typ 1 bei Kindern, die genetisch nicht prädisponiert sind, spricht für eine wichtige Komponente verschiedener Umweltfaktoren in der Ätiologie der Erkrankung (Ilonen, Lempainen, and Veijola 2019). So wurden bereits Virusinfektionen wie Mumps, Röteln oder Infektionen mit Enteroviren (Sadeharju et al. 2003), Impfungen (Morgan et al. 2016) oder die verminderte Exposition gegenüber mikrobiellen Antigenen durch hohe hygienische Standards als Initiatoren der Erkrankung diskutiert (Rewers and Ludvigsson 2016). Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass ernährungsassoziierte Aspekte wie eine hohe Glutenaufnahme der Mutter in der Schwangerschaft (Antvorskov et al. 2018), Dysbiosen des Darms (Groele, Szajewska, and Szypowska 2017) oder Übergewicht im frühen Kindesalter (Corbin et al. 2018) das Immunsystem so beeinflussen könnten, dass autoimmune Reaktionen daraus resultieren können (Ilonen, Lempainen, and Veijola 2019). Dabei treten bei Diabetes mellitus Typ 1-Patienten weitere autoimmune Erkrankungen

weitaus häufiger auf, als bei der restlichen Bevölkerung (Fallahi et al. 2016). So weisen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 eine erhöhte Prävalenz für die Entwicklung einer Autoimmunthyreoiditis, der Zöliakie oder der Addison-Krankheit auf (Kakleas et al. 2015).

Autoimmunerkrankungen entstehen als Folge einer pathologisch aktivierten, adaptiven Immunantwort, die zum Verlust der Toleranz gegenüber eigenen Antigenen und somit zu überschießenden Immunreaktionen führt (Funes et al. 2019). Autoreaktive CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind dabei maßgeblich an der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen beteiligt (Di Dedda et al. 2019). Sie infiltrieren die Pankreasinseln und werden durch verschiedene körpereigene Peptide aktiviert (Pathiraja et al. 2015). Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen dominieren die Insulitis und induzieren nach Aktivierung einen  $\beta$ -Zell-Untergang durch zytolytische Moleküle (Trivedi et al. 2016). Durch Interaktionen autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen werden Autoantikörper produziert, die bei nahezu allen Typ-1-Diabetikern zum Zeitpunkt der Manifestation gegen ein oder mehrere  $\beta$ -Zell-Antigene nachweisbar sind (Pociot and Lernmark 2016). Charakteristisch sind Autoantikörper gegen die körpereigenen pankreatischen Inselzellen, gegen Insulin, gegen die Tyrosinphosphatasen IA-2 und IA-2 $\beta$ , gegen die Glutamatdecarboxylase (insbesondere Isoform GAD65) und gegen den Zinktransporter 8 (Lund-Blix et al. 2019). CD4<sup>+</sup> T-Zellen interagieren darüber hinaus mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen und beeinflussen somit durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine die Polarisierung von Makrophagen zum stark proinflammatorischen M1-Makrophagenphänotyp (Calderon et al. 2008). Die zentrale Rolle der autoreaktiven T-Zellen in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 begründet das große Forschungsinteresse für Therapieversuche in diesen Zellen (Burrack, Martinov, and Fife 2017).

Die Autoantikörper gelten neben ihrem diagnostischen Wert als derzeit beste prädiktive Marker für ein Diabetesrisiko-Screening (Bonifacio et al. 2018). Sie sind bereits Jahre vor der Manifestation des Diabetes mellitus messbar, wobei eine starke, positive Korrelation zwischen der Anzahl positiver  $\beta$ -Zell-Autoantikörper und dem Erkrankungsrisiko in den nächsten Jahren festgestellt werden konnte (Pociot and Lernmark 2016). Während Typ 1-Diabetesrisiko Screenings schon in den ersten Lebensjahren eine Abschätzung des Erkrankungsrisikos durch den Nachweis von Autoantikörpern im Serum erlauben, sind effiziente Präventionsstrategien zur Verhinderung von Progression und Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1

Gegenstand intensiver Forschung (Roep, Wheeler, and Peakman 2019; Atkinson et al. 2019). So führten zahlreiche Primärpräventionsstudien mit diätetischen Interventionen (Writing Group for the Trigr Study Group 2018; Beyerlein et al. 2014) oder der oralen oder nasalen Applikation von Insulin (Nanto-Salonen et al. 2008; Bonifacio et al. 2015) bisher zu keinem endgültigen Erfolg in der Verhinderung einer Krankheitsentwicklung des Diabetes mellitus Typ 1. Aktuelle Erkenntnisse weisen darauf hin, dass durch eine Immuntherapie mit dem anti-CD3-monoklonalen Antikörper Teplizumab bei nicht-diabetischen Verwandten von Typ-1-Diabetespatienten mit hohem Erkrankungsrisiko eine verzögerte Progression zum klinisch manifesten Diabetes mellitus Typ 1 induziert werden konnte (Dayan et al. 2019; Herold et al. 2019).

### **2.2.2 Diabetes mellitus Typ 2**

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist weltweit eine der am häufigsten auftretenden chronischen Erkrankungen des Stoffwechsels und ist als multifaktorielle, progredient verlaufende Erkrankung insbesondere durch eine inadäquate Insulinsekretion und eine periphere Insulinresistenz charakterisiert (Chow and Chan 2020).

Etwa 405,6 Millionen Menschen sind weltweit vom Diabetes mellitus Typ 2 betroffen, wobei eine steigende Prävalenz seit Jahren zu beobachten ist (Saeedi et al. 2019). Parallel zum ansteigenden Übergewicht im Kindes- und Jugendalter, konnte ebenfalls eine steigende Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 2 im Alter von unter 21 Jahren beobachtet werden (Van Name et al. 2020). Neben Adipositas gehören Bewegungsmangel und die genetische Prädisposition zu den großen Risikofaktoren der Krankheitsentwicklung (Zhang et al. 2020). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen haben Haplotypen des HLA Klasse II-Genlocus, der mit der Entstehung für Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert ist, auch in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachweisen können und damit mögliche Gemeinsamkeiten in der Ätiologie der beiden Diabetesformen entdeckt (Jacobi et al. 2020).

Das gemeinsame Auftreten von abdominaler Adipositas, Hyperglykämie, Dyslipidämie sowie arterieller Hypertonie bildet das Krankheitsbild des metabolischen Syndroms, welches als Komplex ein hohes Risikopotential für kardiovaskuläre Erkrankungen und der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 aufweist (Avolio et al. 2020). Darüber hinaus führt eine bereits bestehende, gestörte Glukosehomöostase, welche mit einer

erhöhten Nüchternblutglukose und einer gestörten Glukosetoleranz als Kennzeichen des Prädiabetes einhergeht, ebenfalls zu einem erhöhten Risiko im späteren Verlauf an einem Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken (Punthakee, Goldenberg, and Katz 2018).

Eine zentrale Rolle im diabetischen Geschehen nimmt Insulin als sekretiertes, anaboles Peptidhormon der  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Langerhans'schen Inseln ein (Czech 2017). Es besitzt wichtige regulatorische Funktionen hinsichtlich des Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsels, der zellulären Glukoseaufnahme sowie der Förderung von Zellteilungen und Zellwachstum und weist weiterhin eine anti-inflammatorische Wirkung auf (van Niekerk, Christowitz, et al. 2019). Die sich entwickelnde Insulinresistenz im Diabetes mellitus Typ 2 kann als eine verminderte Wirksamkeit von Insulin an den Zielorganen, welche hauptsächlich Leber, Muskel und Fettgewebe betreffen, beschrieben werden und geht in der Folge mit Störungen in der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase einher (Haas and Biddinger 2009). Der häufigste Grund einer Insulinresistenz ist abdominale Adipositas (Despres and Lemieux 2006). Das Fettgewebe ist ein endokrinologisch aktives Organ, das neben Hormonen wie etwa Adiponektin und Leptin auch Zytokine wie den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-6 sekretiert (Jaganathan, Ravindran, and Dhanasekaran 2018). Zusätzlich polarisieren im Fettgewebe adipöser Patienten vermehrt Makrophagen in den proinflammatorischen Phänotyp M1, welcher durch eine erhöhte Sekretion von TNF $\alpha$  sowie Interleukin-6 gekennzeichnet ist und somit zu einer Entstehung inflammatorischer Prozesse beiträgt (Koppaka et al. 2013). Welche molekularen Mechanismen diese Polarisierung und damit die Entstehung der Inflammation genau beeinflussen, ist nicht abschließend geklärt, in Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine übermäßige Zufuhr an Nahrungsfett den Polaritätswechsel von M2- zu M1-Makrophagen bewirken kann (Park et al. 2016). Während sich M2-Makrophagen durch eine niedrige Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie etwa Interleukin-6 und TNF- $\alpha$  und eine hohe Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie etwa Interleukin-10 auszeichnen, kehrt sich dieses Verhältnis bei den M1-Makrophagen um (McLaughlin et al. 2017). Zusätzlich akkumulieren freie Fettsäuren in den Makrophagen, die durch die fehlende Wirkung des Insulins und der insulinvermittelten Hemmung der Lipolyse vermehrt anfallen (Guilherme et al. 2008). Diese freien Fettsäuren induzieren eine verstärkte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, welche wiederum Inflammasomen aktivieren und

schlussendlich über die Synthese der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-18 weitere Entzündungsprozesse generieren (Guo, Callaway, and Ting 2015). Auch über den Toll-like Rezeptor 4, der auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, können freie Fettsäuren gebunden und inflammatorische Signalwege aktiviert werden (McLaughlin et al. 2017). Die durch freie Fettsäuren induzierte Signaltransduktion wird als wichtiger Immunmechanismus in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 und der daraus resultierenden Folgeerkrankungen angesehen (Yu et al. 2020). Während die M1-Makrophagen bei schlanken Personen nur etwa 10% des Fettgewebes ausmachen, kann ihr Anteil bei zunehmender intraabdomineller Fettmasse bis auf 40% ansteigen (Weisberg et al. 2003). Neben den Makrophagen wandern weitere Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen in das Fettgewebe ein und verstärken die inflammatorischen Prozesse und die Makrophageninfiltration (Zatterale et al. 2019). So wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöht im Fettgewebe adipöser Mäuse auftreten, die die Makrophagenpolarisierung und deren Chemotaxis beeinflussen (Nishimura et al. 2009). Ebenso rekrutierten erhöhte B-Zell-Anteile im Fettgewebe adipöser Mäuse durch die Produktion von Chemokinen neutrophile Granulozyten, T-Zellen und Monozyten in das entzündete Gewebe (Kane and Lynch 2019). Eine wichtige Funktion übernimmt in diesem Zusammenhang das Protein Monozyten-Chemotaktisches Protein 1, das die Monozyten aus den Blutgefäßen anlockt und so die Akkumulation von Makrophagen im Fettgewebe verstärkt (Koppaka et al. 2013). Der Anteil der differenzierten, proinflammatorischen Th1-CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte erhöht im Fettgewebe von adipösen Menschen nachgewiesen werden, wobei die Sekretion von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) eine zusätzliche inflammatorische Komponente darstellt (Travers et al. 2015). Insbesondere das von den Makrophagen sekretierte TNF $\alpha$  hemmt die Signalwirkung des Insulins, sodass sensitive Zellen des Körpers, insbesondere im Fett- und Muskelgewebe, allmählich resistent werden (van Niekerk, Christowitz, et al. 2019). Eine chronische Hyperglykämie, die durch die zunehmende Insulinresistenz entsteht, kann zunächst mit einer kompensatorisch gesteigerten Insulinsekretion ausgeglichen werden (Czech 2017). Der Verlust der insulinvermittelten, hemmenden Wirkung auf die Lipolyse und Glukoneogenese resultiert jedoch aus einer weiteren Mobilisation von freien Fettsäuren im Fettgewebe und aus einer, trotz Hyperglykämie, gesteigerten Glukoseproduktion in der Leber (Czech 2017). So führt die verminderte Wirkung von Insulin pathophysiologisch in den

Zielorganen in der Folge im Sinne eines Circulus vitiosus zunächst zu metabolischen Entgleisungen und in der Folge zu erschöpften Kompensationsmechanismen, die zur Manifestation des Diabetes mellitus Typ 2 wesentlich beitragen (Zatterale et al. 2019).

### **2.2.3 Monogene Diabetesformen**

Beim Menschen werden etwa 1-4% der Diabetes mellitus-Erkrankungen durch monogenetische Defekte verursacht, die unter dem Begriff „maturity-onset diabetes of the young“ (MODY) zusammengefasst werden (Shields and Colclough 2017). Sie stellen eine heterogene Gruppe derzeit 14 bekannter MODY-Varianten dar, die zum einen die  $\beta$ -Zell-Funktion und Insulinproduktion beeinträchtigen oder zum anderen eine gestörte Insulinwirkung bedingen können (Kummer, Reinauer, and Meissner 2015; Sousa and Bruges-Armas 2019). Charakteristisch für den Phänotyp der bekannten MODY-Varianten ist die frühe Manifestation des Diabetes mellitus meist vor Erreichen des 25. Lebensjahres, die Abwesenheit von Autoantikörpern gegen Inselzellen, Glutamatdecarboxylase und Tyrosinphosphatasen, die fehlende Adipositas oder Insulinresistenz sowie eine moderate Hyperglykämie (Bishay and Greenfield 2016). Zur Diagnostik und zur Risikobewertung für Verwandte werden Gentests durchgeführt, um die jeweilige Genmutation bestimmen zu können (Lemelman, Letourneau, and Greeley 2018).

Als häufigste MODY-Formen treten pathogene Varianten in den Genen des Hepatozyten Nuklearfaktors-1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ), des Hepatozyten Nuklearfaktors-4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) und der Glukokinase (GCK) auf (Gaal and Balogh 2019). HNF1 $\alpha$  und HNF4 $\alpha$  kodieren für Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der glukoseabhängigen Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen beteiligt sind (Shields et al. 2010). Mutationen in diesen Genen bedingen demzufolge eine unzureichende Insulinsekretion (Shields et al. 2010). Das kodierte Enzym des GCK-Gens Glukokinase dient als Glukosesensor der Zelle (Osbaek et al. 2009). Pathogene Genvarianten können somit eine Aktivitätsreduzierung des Enzyms in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen verursachen, welche erst bei erhöhter Blutglukosekonzentration mit einer Insulinsekretion reagieren (Osbaek et al. 2009). Eine weitere Form eines monogenen Diabetes mellitus kann durch eine maternal bedingte Mutation in der mitochondrialen DNA verursacht werden (Kavvoura and Owen 2019). In der Folge kann eine Störung in der mitochondrialen

Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung eine Dysfunktion der  $\beta$ -Zellen sowie eine eingeschränkte Insulinsekretion verursachen (Kavvoura and Owen 2019). Eine weitere Einteilung der monogenetischen Diabetesformen betrifft diabetogene Stoffwechsellagen, die innerhalb der ersten 6 Lebensmonate auftreten und folglich als neonataler Diabetes mellitus bezeichnet werden (Sousa and Bruges-Armas 2019). Dieser kann, je nach Dauer der Insulinabhängigkeit, transient oder permanent sein (Gaal and Balogh 2019). Klinische Kardinalsymptome der Erkrankung gehen mit einer intrauterinen Wachstumsverzögerung und einer Dehydratation bei fehlender Ketoazidose einher (Bens, Siebert, and Caliebe 2010). Außerdem sind eine Hyperglykämie sowie niedrige Insulinwerte in den ersten Monaten des Lebens bezeichnend (Lemelman, Letourneau, and Greeley 2018). Während sich der transiente neonatale Diabetes mellitus in den ersten Lebenswochen manifestiert und sich bis zum 18. Lebensmonat normalisiert, bleibt ein permanenter neonataler Diabetes mellitus *per definitionem* über den 18. Lebensmonat hinaus bestehen (Gaal and Balogh 2019). Die jeweilige Genmutation, die den neonatalen Diabetes mellitus verursacht, kann in verschiedenen Genen vorliegen, wobei die transiente oder permanente Form nicht zwangsläufig mit einer bestimmten Lokalität der Mutation zusammenhängt (Gole et al. 2018). So wurden Mutationen im KCNJ11-Gen, welches für ein Membranprotein und Teil des ATP-sensitiven Kaliumkanals in den  $\beta$ -Zellen kodiert, sowohl in Kindern mit transientem als auch mit permanentem neonatalen Diabetes mellitus identifiziert (Gole et al. 2018; Greeley, Letourneau, and Philipson 2018).

#### **2.2.4 Mutationen des Insulingens**

Weiterhin konnten mittels molekulargenetischer Methoden häufig Mutationen im Insulin (INS)-Gen als Ursache eines permanenten neonatalen Diabetes mellitus identifiziert werden (Stoy et al. 2007; Wasserman et al. 2016; Amiruddin et al. 2019). Derzeit sind über 50 Mutationen im Insulingen des Menschen bekannt, die die Biosynthese des Insulins in pankreatischen  $\beta$ -Zellen essentiell beeinflussen und die, je nach Art der Mutation und der Höhe des exprimierten Proteins, in ihrer klinischen Ausprägung, im Ausmaß der Insulindefizienz und im Alter der Manifestation des Diabetes mellitus variieren können (Liu et al. 2015). Die meisten der INS-Mutationen

werden autosomal dominant vererbt und können dem Syndrom des Mutant INS gene-induced Diabetes of Youth (MIDY) zugeordnet werden (Liu, Hodish, et al. 2010).

Das Insulingen des Menschen kodiert für das Prä-Proinsulin, welches noch während der Translation vom Prä-Peptidanteil getrennt wird, um dann in das endoplasmatische Retikulum (ER) als Proinsulin einzutreten (Liu, Weiss, et al. 2018). In den meisten Fällen der INS-Mutationen akkumuliert Proinsulin aufgrund von Fehlfaltungen im ER und verursacht chronischen ER-Stress, der, wenn er nicht mehr bewältigt werden kann, eine progrediente  $\beta$ -Zell-Apoptose induziert (Liu, Weiss, et al. 2018). Ein intrinsischer Reparaturmechanismus aus mehreren Signalwegen, die sogenannte Unfolded Protein Response (UPR), wird bei Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER aktiviert, um die Homöostase wiederherzustellen (Riahi et al. 2018). Hierfür werden UPR-assoziierte Gene exprimiert, die protektive Effekte auf das ER besitzen und die Proteinefehlfaltungen durch eine gesteigerte Synthese von Chaperonen reparieren oder sie proteosomal abbauen können (Walter and Ron 2011). Chronischer ER-Stress kann von der UPR nicht korrigiert werden, in diesem Fall induziert die UPR die Apoptose der  $\beta$ -Zelle (Riahi et al. 2018).

### **2.3 Diabetes mellitus in der Tiermedizin**

Neben der humanmedizinischen Relevanz spielt der spontan auftretende Diabetes mellitus auch innerhalb der Tiermedizin, vor allem bei Hunden und Katzen, eine wichtige Rolle (Behrend et al. 2018).

Klinische Symptome bei Hunden und Katzen und eine Glukosurie treten dabei erst nach Überschreitung des renalen Schwellenpotentials für die Glukoseresorption auf, welches bei Hunden etwa zwischen 180 und 220mg/dl und bei Katzen zwischen 200 und 280mg/dl liegt (Nelson and Reusch 2014). Die Tiere werden in der tierärztlichen Praxis häufig mit der klinischen Symptomatik einer auftretenden Polyurie, Polydipsie, Polyphagie sowie auffälligem Gewichtsverlust vorgestellt (Behrend et al. 2018). Derzeit gibt es keine standardisierten Diagnosekriterien, die einen Diabetes mellitus oder Prädiabetes in Hunden und Katzen eindeutig klassifizieren (Behrend et al. 2018). Da jedoch physiologische Nüchtern-Blutglukosewerte in Hunden und Katzen denen des Menschen ähnlich sind, geben persistierende Nüchtern-Blutglukosewerte von  $>144$  mg/dl ( $>8$ mmol/l) beim Hund und  $>126$ mg/dl ( $>7$ mmol/l) bei der Katze sowie zusätzlich erhöhte Fruktosaminwerte und erhöhte Werte glykierten Hämoglobins

eindeutige Hinweise auf die Manifestation einer diabetogenen Stoffwechsellage (Gilor et al. 2016).

Beim Hund tritt ein Diabetes mellitus in etwa 50% der Fälle aufgrund einer immundiagnostizierten Zerstörung der  $\beta$ -Zellen auf (Davison, Herrtage, and Catchpole 2011). Diese Form des Diabetes mellitus in Hunden weist Parallelen zum Diabetes mellitus Typ 1 im Menschen auf und ist durch eine Hypoinsulinämie charakterisiert, die eine Insulinsubstitution zur Vermeidung einer Ketoazidose unbedingt notwendig macht (Nelson and Reusch 2014). Die Ätiologie dieser Diabetesform ist auch beim Hund multifaktoriell, wobei mit Diabetes mellitus assoziierte Genloci des Menschen auch bei Hunden mit einem erhöhten Risiko einer Diabetes mellitus-Manifestation assoziiert werden konnten (Catchpole et al. 2013). Sowohl Mutationen im Insulingen, als auch bestimmte Genvarianten des caninen DLA (dog leukocyte antigen)-Systems, dessen Gene für MHC-Klasse II-Moleküle kodieren und mit dem HLA-System des Menschen zu vergleichen sind, konnten dabei mit einer Prädisposition für eine Diabetes mellitus-Erkrankung in verschiedenen Rassen assoziiert werden (Catchpole et al. 2013). Unterschiede bestehen jedoch im Nachweis von Autoantikörpern gegen körpereigene pankreatische Inselzellen, Insulin, Tyrosinphosphatase IA-2 und gegen die Glutamatdecarboxylase 65, deren Nachweis in nahezu allen Diabetes mellitus Typ 1-Patienten möglich und charakteristisch ist (Pociot and Lernmark 2016). Im Hund werden sie jedoch in weitaus geringerer Häufigkeit nachgewiesen, weshalb sie als Biomarker keine Relevanz beim Diabetes mellitus des Hundes haben (O'Kell et al. 2017).

Diabetische Katzen weisen auffallende Ähnlichkeit in der klinischen Charakteristik sowie der Entwicklung von Folgeerkrankungen mit dem Diabetes mellitus Typ 2 des Menschen auf (Gilor et al. 2016). Neben einer Insulinresistenz, der abnehmenden Insulinsekretion und  $\beta$ -Zell-Masse sowie histopathologischer Amyloidablagerungen in den Langerhans'schen Inseln, wie sie auch im Menschen beschrieben sind, entwickeln diabetische Katzen ebenfalls periphere Polyneuropathien und Retinopathien (Henson and O'Brien 2006; Nelson and Reusch 2014). Den größten Risikofaktor, der wesentlich zur Entwicklung eines Diabetes mellitus in Katzen beiträgt und ebenfalls große Parallelen zum Diabetes mellitus Typ 2 des Menschen aufweist, bildet eine Adipositas (Ohlund et al. 2017). Wie beim Menschen, ist das Fettgewebe der Katze ein hormonell aktives Organ (Williams et al. 2019). So wurde in Untersuchungen mit diabetischen Katzen gezeigt, dass die Synthese von Adiponektin im Fettgewebe, das

physiologischerweise die Insulinsensitivität erhöht und anti-inflammatorische Wirkung besitzt, vermindert synthetisiert wurde und somit eine Insulinresistenz und inflammatorische Prozesse förderte (Williams et al. 2019). Des Weiteren wurden im Fettgewebe adipöser Katzen erhöhte T-Zellpopulationen sowie erhöhte Expressionen von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  im Vergleich zu schlanken Katzen festgestellt, die eine Insulinresistenz begünstigen könnten (Van de Velde et al. 2013).

Demgegenüber konnte in Untersuchungen adipöser Hunde zwar ebenfalls eine Entwicklung einer Insulinresistenz sowie darüber hinaus eine kompensatorisch gesteigerte Insulinproduktion, jedoch keine Diabetes mellitus Typ 2-Manifestation innerhalb der folgenden 2 Jahre festgestellt werden (Verkest et al. 2012). Unter Berücksichtigung der kompensatorischen Hyperinsulinämie bei gleichzeitiger Insulinresistenz wurde vermutet, dass einige ätiopathogenetische Mechanismen, die in der Adipositas-assoziierten Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 in Menschen und Katzen relevant sind, bei Hunden womöglich keine Rolle spielen (Nelson and Reusch 2014).

Während der Diabetes mellitus bei Hunden und Katzen häufiger auftritt (Gilor et al. 2016), kommt diese Erkrankung bei Wiederkäuern nur selten vor (Doherty, Healy, and Donnelly 1998). Bei einigen Rindern wurden Fallbeispiele einer, dem autoimmunen Diabetes mellitus Typ 1-vergleichbaren, diabetischen Erkrankung mit starker Abmagerung, Indigestion, Polyurie und Polydipsie beschrieben, welche histopathologisch eine Atrophie sowie lymphozytäre Infiltration der pankreatischen Langerhans'schen-Inseln aufwiesen (Taniyama et al. 1993; Doherty, Healy, and Donnelly 1998).

Dagegen weitaus häufiger tritt eine spontane, diabetogene Stoffwechsellage bei Pferden und Ponys auf (Morgan, Keen, and McGowan 2015; Durham et al. 2019).

Das equine metabolische Syndrom (EMS), welches nach dem metabolischen Syndrom im Menschen benannt wurde, stellt einen Symptomkomplex dar, der große tiermedizinische Relevanz besitzt und die Aufklärung ätiologischer und pathophysiologischer Mechanismen von metabolischen Erkrankungen hinsichtlich ihrer Prophylaxe zwingend notwendig macht (Ragno et al. 2019). Charakteristisch beim EMS ist die Entwicklung einer Insulindysfunktion, welche sich in einer Imbalance zwischen Plasmakonzentrationen von Insulin, Glukose und Plasmalipiden und in einer hohen basalen oder postprandialen Hyperinsulinämie äußert, wobei eine Hyperglykämie nicht zwangsläufig auftreten muss (Durham et al. 2019). Eine

Insulinresistenz kann ebenfalls gleichzeitig auftreten, ist jedoch weder eine Voraussetzung für die Entstehung einer Insulindysfunktion im EMS, noch für die häufig daraus resultierende endokrinopathische Hufrehe (de Laat, McGree, and Sillence 2016). Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie der EMS sowie die genaue Klärung der Pathomechanismen bisher unzureichend bekannt (Ragno et al. 2019). Adipositas als Risikofaktor sowie eine gastrointestinale Komponente hinsichtlich der Inkretin-abhängigen Insulinsekretion in der Ätiologie der Insulindysfunktion sind beschrieben (de Laat, McGree, and Sillence 2016). Zudem konnten bei adipösen Pferden sowie bei Pferden, bei denen eine Insulindysfunktion festgestellt wurde, im Fettgewebe erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine sowie ein inflammatorischer Phänotyp festgestellt werden, was die Bedeutung einer immunologischen Komponente in der EMS unterstreicht (Reynolds et al. 2019). Die Hyperinsulinämie ist der hauptsächliche pathophysiologische Initiator einer endokrinopathischen Hufrehe (Durham et al. 2019). Bei gesunden Pferden und Ponys konnte durch eine experimentell induzierte Hyperinsulinämie eine klinisch manifeste Hufrehe ausgelöst werden (de Laat et al. 2016). Des Weiteren konnte in Untersuchungen mit an Hufrehe erkrankten Pferden bei 2/3 der Pferde eine Hyperinsulinämie labordiagnostisch nachgewiesen werden (Karikoski et al. 2011). Zusammenhänge zwischen erhöhten Triglycerid- und Leptin- sowie erniedrigten Adiponektinkonzentrationen sind ebenfalls mit dem Risiko der Entwicklung einer Hufrehe in Ponys beschrieben (Menzies-Gow, Harris, and Elliott 2017). Prädisponiert sind Pferde und Ponys mittleren Alters, die durch hoch energetisches Futter bei gleichzeitig fehlender entsprechender Leistung eine schnelle Gewichtszunahme entwickeln und in der Folge ein gesteigertes Risiko einer endokrinopathisch bedingten Hufrehe aufweisen (Morgan, Keen, and McGowan 2015). Da die Hufrehe jedoch derzeit nur symptomatisch und nicht kausal behandelt werden kann, ist eine frühzeitige Erkennung prädisponierter Tiere und eine rechtzeitige Diagnose unabdingbar (Durham et al. 2019).

## **2.4 Tiermodelle in der translationalen Diabetes mellitus-Forschung**

Neben spontan auftretendem Diabetes mellitus in Haustieren, können Störungen des Glukosestoffwechsels experimentell in Tieren induziert werden (Fang et al. 2019). Tiermodelle sind für die krankheitsorientierte Grundlagenforschung mit Hinblick auf die Untersuchung von Ätiologien, Pathophysiologien und zur Evaluierung von Wirksamkeit

und Sicherheit neuer Medikamente und Behandlungsmethoden für die klinische Anwendung im Menschen von entscheidender Bedeutung (Walters et al. 2012). In diesem Zusammenhang sind Nagermodelle wie Mäuse und Ratten am weitesten verbreitet, doch auch Großtiermodelle wie Schweine, Primaten, Hunde und Katzen haben aufgrund ihrer größeren physiologischen Ähnlichkeit zum Menschen in der translationalen Forschung einen großen Stellenwert (Kleinert et al. 2018). Die Wahl des Diabetesmodells ist von der jeweiligen Fragestellung abhängig, da aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie und komplexen Pathogenese kein Tiermodell alle Aspekte des Diabetes mellitus des Menschen in seinem gesamten Spektrum widerspiegelt (Renner et al. 2016).

Für die Etablierung diabetischer Tiermodelle stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Mittels partieller oder totaler Pankreatektomie konnte in Hunden (Fisher et al. 2001), Schweinen (Strauss et al. 2012; Morel et al. 1991) und Primaten (He et al. 2011) eine diabetogene Stoffwechsellage induziert werden. Die totale Pankreatektomie wird in porzinen Diabetesmodellen für präklinische Inselzelltransplantationsstudien verwendet (Renner et al. 2020). Aufgrund der intensiven Nachbehandlung der Tiere, häufig auftretenden postoperativen Malabsorptionen und einer hohen Letalität sowie ethischen Bedenken werden jedoch andere Techniken zur Diabetesinduktion bevorzugt (Renner et al. 2016; Renner et al. 2020). Zusätzlich entspricht die vollständige Entfernung des Pankreas nicht der Stoffwechselsituation eines Diabetes mellitus Typ 1 oder Diabetes mellitus Typ 2, in welcher nur das endokrine Kompartiment des Pankreas betroffen ist (Fonouni et al. 2015).

Weiterhin konnte eine Diabetesinduktion in Nagern, Hunden, Schweinen und Primaten durch eine chemisch-vermittelte Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen mittels Streptozotocin oder Alloxan erreicht werden (Ionut et al. 2010; King 2012). Es handelt sich dabei um Glukose-Analoga, die via GLUT2-Transporter in die Zellen transportiert werden und durch die Generierung freier Radikale die Apoptose der Zelle induzieren (Lenzen 2008). Bei hoher Applikation wurde ein permanenter hyperglykämischer und hypoinsulinämischer Status nach ungefähr 12-48h erreicht, wobei die Tiere durch die unkontrollierte Insulinsekretion in Folge des  $\beta$ -Zell-Untergangs kurzzeitig in eine massive transiente Hypoglykämie fielen (Lenzen 2008). Diese Methode erwies sich als wenig invasiv, zeitsparend und bedurfte keiner intensiven Nachbehandlung im Vergleich zu einer Pankreatektomie, dennoch traten

irreversible toxische Organschädigungen auch in der Leber und Niere durch die vermehrte Expression von GLUT2 dosisabhängig auf (Lenzen 2008). Zusätzlich wurde das karzinogene Potential von Streptozotocin in der Niere und Leber der Ratte und in Nierenzellen von Menschen *in vitro* beschrieben (Lauder et al. 1981; Robbiano et al. 1996). Eine Möglichkeit zur Induktion prädiabetischer Modelle bietet eine kalorien- und fettreiche Diät, die den Glukose- und Lipidmetabolismus moduliert und so die Charakteristik des metabolischen Syndroms erzeugen soll (Kleinert et al. 2018).

Genetisch modifizierte Tiermodelle bieten die Möglichkeit, verschiedene diabetische Modelle für diverse Fragestellungen präzise auf molekularer Ebene zu generieren (Renner et al. 2020). Mit der gezielten Genom-Editierung durch CRISPR/Cas können dabei beispielsweise transgene Tiere für die translationale Forschung generiert werden, bei denen, je nach Fragestellung, Fremd-DNA ins Genom eingefügt oder ein Gen inaktiviert werden kann (Pickar-Oliver and Gersbach 2019).

### **2.4.1 Nagermodelle in der Diabetesforschung**

Mäuse und Ratten sind zurzeit aufgrund ihrer geringen Anschaffungs- und Erhaltungskosten, der Möglichkeit standardisierter hygienischer Haltungsmöglichkeiten, ihrer schnellen Reproduktion, einem umfangreichen Spektrum an Technologien zur genetischen Modifikation und der Verfügbarkeit einer murinen Gendatenbank, die dominierenden Spezies in der biomedizinischen Forschung (Renner et al. 2016). Zahlreiche Maus- und Ratten-Stämme wurden unter anderem durch spontane Mutationen und Inzucht, chemisch-medikamentöser oder fütterungsbedingter Induktion oder mittels genetischer Modifikation als diabetische Modelle zur Erforschung verschiedener Fragestellungen etabliert (Murfit et al. 2018). So wurde das häufig verwendete Diabetes mellitus Typ 1-Mausmodell der NOD (non-obese diabetic)-Maus durch selektive Inzucht generiert (Reed and Herold 2015). Die NOD-Mäuse entwickelten nach etwa 4 Wochen eine Insulinitis, welche pathogenetisch auf einer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zell-medierten Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas beruhte und in einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus resultierte, wobei weibliche NOD-Mäuse den Diabetes mellitus Typ 1 früher und ausgeprägter entwickelten als männliche NOD-Mäuse (Leiter 2001). Weit verbreitete Nagermodelle für die Untersuchung eines Diät-induzierten Diabetes mellitus Typ 2 sind zum einen der murine Inzuchtstamm C57BL/6J mit genetischer Prädisposition zur Adipositas,

Insulinresistenz und erhöhter Glukoseintoleranz (Surwit et al. 1988). Zum anderen gibt es die ebenfalls durch Inzucht generierten Zucker-Ratten (Zucker Diabetic Fatty, ZDF), die aufgrund eines mutierten Leptin-Rezeptors eine Hyperphagie aufweisen und bei denen die daraus resultierende Adipositas nach etwa 4 Wochen eine Hyperinsulinämie, Hyperlipidämie, Hypertension und gestörte Glukosetoleranz, jedoch keine erhöhte Nüchternblutglukose bedingt (Peterson et al. 1990).

Mit der Akita-Maus wurde ein murines monogenes Diabetesmodell für den Mutant *INS* gene-induced Diabetes of Youth entwickelt (Liu, Haataja, et al. 2010). Heterozygote *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse tragen im Insulin 2 (*Ins2*)-Gen eine C96Y-Mutation, die auch im Insulingen des Menschen identifiziert werden konnte (Yoshioka et al. 1997; Stoy et al. 2007). Diese Mutation hat einen Aminosäureaustausch von Cystein durch Tyrosin und eine daraus resultierende Proteinfehlfaltung von Proinsulin 2 zur Folge, welche im ER akkumuliert und final zu einer  $\beta$ -Zell-Apoptose führt (Wang et al. 1999). In der Folge entwickelten *Ins2<sup>Akita</sup>*-Mäuse im Alter von wenigen Wochen einen insulinabhängigen Diabetes mellitus mit einhergehender gestörter Insulinsekretion und Hyperglykämie (Yoshioka et al. 1997).

Trotz vieler Vorteile sind diabetische Nagermodelle für die translationale Forschung bislang nicht ausreichend (Kleinert et al. 2018). So zeigen die Befunde aus Nagermodellstudien eindeutige Limitationen in der Vorhersagbarkeit therapeutischer Wirkungen im Menschen (Hay et al. 2014; Aigner et al. 2008).

#### **2.4.2 Großtiermodelle in der Diabetesforschung**

Ergänzend zu Nagermodellen sind Großtiermodelle in der translationalen Diabetes mellitus-Forschung von großer Relevanz (Kleinert et al. 2018).

Primaten wie Rhesus- (*Macaca mulatta*) und Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) sind phylogenetisch dem Menschen sehr nah und dienen ebenfalls seit langer Zeit der Diabetes mellitus-Forschung. Sie können, vergleichend zum Menschen, mit zunehmendem Alter und Disposition zur Adipositas einen spontanen Diabetes mellitus Typ 2 entwickeln (Cefalu 2006). Im Gegensatz zu Nagermodellen zeigen Primaten große Übereinstimmungen mit dem Menschen hinsichtlich ihrer Anatomie, Physiologie und in besonderer Weise in ihrem Glukose- und Lipidstoffwechsel und ermöglichen so effizientere, präklinische Studien für neue Therapieansätze in der Diabetes mellitus-Forschung (Pound, Kievit, and Grove 2014). Darüber hinaus werden diabetische

Primaten aktuell als präklinisches Modell für die Xenotransplantation von porzinen Pankreasinseln eingesetzt (Ludwig et al. 2017). Trotz der vielen translationalen Vorteile und der besonderen Stellung als Tiermodell zwischen Grundlagenforschung und klinischen Studien beim Menschen, bleiben Primaten zum einen als zumeist unipare Säugetiere mit einem langen Generationsintervall sowie zum anderen durch die mangelnde ethische Akzeptanz ein kostenintensives und kritisches translationales Modell (Kleinert et al. 2018).

Schweine hingegen haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung als Großtiermodell in der biomedizinischen Forschung gewonnen (Wolf et al. 2014). Während die spontane Manifestation eines Diabetes mellitus bei Schweinen nicht bekannt ist und auch fütterungsinduziert keine diabetogene Stoffwechsellage erzeugt werden konnte, sind genetisch modifizierte Schweine nützliche Diabetesmodelle für gezielte Fragestellungen und füllen als Großtiermodell die Lücke zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung beim Menschen (Renner et al. 2016).

### **2.4.3 Schweinemodelle in der Diabetesforschung**

Schweine sind in vielerlei Hinsicht ein sehr gut geeignetes Modell für die translationale Diabetesforschung. Sie haben physiologische, anatomische und metabolische Ähnlichkeit zum Menschen und darüber hinaus ideale Reproduktionsvoraussetzungen aufgrund einer verhältnismäßig frühen Geschlechtsreife im Alter von 6-8 Monaten, einer kurzen Tragezeit und multiparen Würfen ohne saisonale Abhängigkeit (Walters et al. 2012; Aigner et al. 2010). Die Physiologie des porzinen Gastrointestinaltrakts und die intestinale Absorption sowie morphologische und pharmakokinetische Eigenschaften des porzinen Pankreas sind den Organsystemen des Menschen sehr ähnlich und bieten somit das Potential zur Untersuchung neuer diabetischer Therapiestrategien (Renner et al. 2016). Durch ihre Größe bieten Schweine zudem die Möglichkeit der Etablierung nicht-invasiver Bildgebungstechniken zur Quantifizierung der  $\beta$ -Zell-Masse (Laurent et al. 2016) oder Diät-induzierter Adipositas (Lee et al. 2009). Ihr großes Blutvolumen ermöglicht die Durchführung von wiederholten metabolischen Tests, clamp-Studien oder Insulin- beziehungsweise Glukose-Toleranz-Tests (Renner et al. 2016). Des Weiteren ist die relative  $\beta$ -Zell-Masse als Parameter zur Beurteilung der absoluten  $\beta$ -Zell-Masse, der Menge und Kapazität der Insulinsekretion und des Insulinreservoirs mit 10 mg/kg vergleichbar bei Schweinen

und Menschen (Saisho et al. 2013; Bock et al. 2003), wohingegen Ratten mit etwa 20 mg/kg (Montanya et al. 2000) und Mäuse je nach Zuchtlinie mit 40-160 mg/kg (Rankin and Kushner 2009; Bock, Pakkenberg, and Buschard 2005) deutlich höhere Relationen aufzeigen. Schweine wiesen in Untersuchungen etwas geringere Nüchterninsulinspiegel im Plasma sowie C-Peptid-Werte als Menschen auf, die Nüchternblutglukosespiegel waren jedoch vergleichbar bei Schwein und Mensch (Renner et al. 2010). Ein wichtiger Vorteil des Schweins liegt im Vergleich zu anderen Großtiermodellen in der größeren ethischen Akzeptanz und in gut etablierten Methoden für gentechnische Modifizierungen (Renner et al. 2020).

## **2.5 INS<sup>C94Y</sup> transgene Schweine als Diabetesmodell**

Durch gezielte genetische Modifikation wurden INS<sup>C94Y</sup> transgene (tg) Schweine generiert, die das mutierte Insulin C94Y exprimieren und als Großtiermodell für den permanenten neonatalen Diabetes mellitus geeignet sind (Renner et al. 2013). Diese Mutation entspricht der C96Y-Mutante in MIDY-Patienten, wobei die Variante C94Y auf dem, im Gegensatz zum humanen Insulin, um zwei Aminosäuren kürzeren porcinen C-Peptid beruht (Wolf et al. 2014). Wie in der Akita-Maus führte die Mutation im porcinen INS<sup>C94Y</sup>-Modell zum Aminosäureaustausch von Cystein durch Tyrosin und somit zu einer gestörten Disulfidbrückenbindung mit Proinsulin-Fehlfaltung, welche schlussendlich in einer  $\beta$ -Zell-Apoptose durch eine erschöpfte Unfolded Protein Response mündet (Liu, Hodish, et al. 2010). Obwohl INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine nach der Geburt bereits nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte Nüchternblutglukose zeigten, war das Gesamt- $\beta$ -Zellvolumen zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern noch unverändert (Renner et al. 2013). Mit Fortschreiten der Erkrankung manifestierte sich ein diabetischer Phänotyp (Renner et al. 2013). Nach 8 Tagen konnten Katarakte wahrgenommen werden und bereits nach 4,5 Monaten war im Vergleich zu den Wurfgeschwister-Wildtypen ein progredienter  $\beta$ -Zell-Verlust von mehr als 70%, eine deutliche Hypoinsulinämie sowie ein vermindertes Körperwachstum festzustellen (Renner et al. 2013). Im Herzmuskelgewebe bei 5-Monate alten INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen wurde eine verminderte Kapillarisation und Minderdurchblutung des Myokards festgestellt (Hinkel et al. 2017). Darüber hinaus entwickelten INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine Diabetes-assoziierte Auffälligkeiten an den Augen (Kleinwort et al. 2017). So zeigten histologische Analysen von Augen zwei Jahre alter

INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine intraretinale, mikrovaskuläre Anomalien und retinale Ödeme als Kennzeichen der diabetischen Retinopathie (Kleinwort et al. 2017). In einer aktuellen Multiomics-Studie, bei der die Leber der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine im Vergleich zu Wildtypen untersucht wurde, konnte eine signifikante Abschwächung von inflammatorischen und immunaktivierenden Signalwegen in den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen identifiziert werden (Backman et al. 2019).

## 2.6 Metabolische Veränderungen von T-Zellen

Für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und Zellfunktion ist die Aufnahme von Glukose für Immunzellen essentiell, weshalb die Regulation der Glukosehomöostase von wesentlicher Bedeutung für das Überleben der Zelle ist (Palmer et al. 2016).

Nach Antigenkontakt verändern CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ihren Aktivierungszustand von ruhenden, naiven T-Zellen zu aktivierten, sich schnell teilenden Effektor-T-Zellen und anschließend zu wiederum ruhenden Gedächtnis-T-Zellen (Domblides, Lartigue, and Faustin 2018). Die unterschiedlichen Funktionszustände sind dabei eng mit Änderungen im zellulären Metabolismus verknüpft (Buck et al. 2017). Dementsprechend muss nach antigenspezifischer Aktivierung des T-Zell-Rezeptorkomplexes sowie kostimulatorischer Rezeptoren die Glukoseaufnahme gesteigert werden, um den Anforderungen einer funktionellen Umstellung hin zu anabolen Stoffwechselprozessen und einer erhöhten glykolytischen Aktivität gerecht zu werden (Gaber et al. 2019). Die Mechanismen der Glukoseaufnahme von T-Zellen *in vivo* sind bisher unzureichend in Hinblick auf ihre Homöostase, Aktivierung und Differenzierung untersucht, jedoch wird dem insulinunabhängigen Glukosetransporter GLUT1 eine wichtige Rolle in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung und Differenzierung bei der Maus und beim Mensch zugeschrieben (Macintyre et al. 2014). So zeigten *in vitro* stimulierte humane und murine T-Zellen nach Aktivierung eine erhöhte Expression von GLUT1 auf ihrer Zelloberfläche sowie eine daraus resultierende gesteigerte Glukoseaufnahme, Glykolyse und ein gesteigertes Zellwachstum (Macintyre et al. 2014). Bei naiven T-Zellen wird die Regulation der Glukoseaufnahme hauptsächlich durch extrazelluläre Signale wie etwa durch Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren bestimmt (MacIver, Michalek, and Rathmell 2013). Sie ist gering und dient einzig der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase (MacIver, Michalek, and Rathmell 2013). Naive T-Zellen generieren ATP hauptsächlich über oxidative

Phosphorylierung (Gaber et al. 2015). Nach der Aktivierung verändern T-Zellen ihren Stoffwechsel und die Effektor-T-Zellen gewinnen das notwendige ATP hauptsächlich über die Glykolyse (Domblides, Lartigue, and Faustin 2018). Dafür wird die Glukoseaufnahme gesteigert, was eine Verfügbarkeit der Substrate notwendig macht (Domblides, Lartigue, and Faustin 2018). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von T-Zellen von der Glukosekonzentration abhängig ist und dass eine verminderte Nährstoffversorgung die Zytokinproduktion herabsetzt (Chang et al. 2015). Nach einer Infektion wird die Umstellung durch die sinkende Substratverfügbarkeit, zu einem katabolen Metabolismus gefördert und einige Zellen differenzieren sich zu Gedächtnis-T-Zellen (Domblides, Lartigue, and Faustin 2018). Die glykolytische Aktivität reduziert sich und die Zellen generieren über oxidative Phosphorylierung das benötigte ATP (Domblides, Lartigue, and Faustin 2018).

Ein weiterer Regulationsmechanismus der Glukosehomöostase von Immunzellen basiert auf Insulinrezeptoren, die nicht von naiven T-Zellen exprimiert werden (Fischer et al. 2017). Insulin besitzt immunmodulierende Eigenschaften, indem es die Zelldifferenzierung und Polarisierung beeinflussen kann und eine anti-inflammatorische Wirkung auf bestimmte inflammatorische Signalwege aufweist (van Niekerk, Christowitz, et al. 2019). Somit moduliert das Peptidhormon auch den metabolischen Immunzellphänotyp (Ferreira et al. 2020). Aus diesem Grund können sich auch Änderungen der Insulinsekretion oder -wirkung maßgeblich auf die Glukosehomöostase der Immunzellen und auf ihre Funktion auswirken (van Niekerk, Christowitz, et al. 2019).

T-Zellen nehmen in der Pathogenese des Diabetes mellitus eine Schlüsselfunktion ein (Gao et al. 2017), sowohl beim Diabetes mellitus Typ 1 hinsichtlich der Initiation der Insulitis (Di Dedda et al. 2019), als auch bei der Entwicklung der chronischen Inflammation im Fettgewebe, die maßgeblich die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 fördert (Zhou et al. 2018).

Funktionelle Veränderungen von T-Zellen sowie Abweichungen der Populationen differenzierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Diabetespatienten konnten in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen werden (Touch, Clement, and Andre 2017; Walker and von Herrath 2016). So zeigten mehrere Studien, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und Fettgewebe von Diabetes mellitus Typ 2-Patienten sich vorwiegend in proinflammatorische Th1- und Th17-Zellen und weniger in Th2-Zellen differenzieren und dass diese Zellen maßgeblich die inflammatorischen Prozesse fördern

(McLaughlin et al. 2014; Nekoua et al. 2016; Cortez-Espinosa et al. 2015). Weitere Daten von Patienten und Mäusen zeigten, dass auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Entzündungsprozesse im Fettgewebe durch die Sekretion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  und auch Interleukin-17 ausüben und in erhöhter Zahl das Gewebe infiltrieren (Luck et al. 2015; Srenathan, Steel, and Taams 2016). Zugleich existieren zahlreiche Untersuchungen, die auf die erhöhten Infektionsraten wie etwa Tuberkulose bei Diabetespatienten hinweisen (Ronacher et al. 2015). Eine Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von diabetischen Tuberkulosepatienten ergab eine deutliche Reduktion der Th1, Th2 und Th17-Zellen und eine Erhöhung von regulatorischen T-Zellen sowie den anti-inflammatorischen Zytokinen Interleukin-10 und TGF- $\beta$  (Kumar et al. 2016). Es konnte ein eindeutig gedämpfter Immunphänotyp der diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden, wodurch Infektionen unzureichend bekämpft werden können (Kumar et al. 2016). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Diabetes mellitus Typ 1-Patienten wurden zwar ebenfalls von zahlreichen Forschungsgruppen untersucht, es konnten jedoch auch hier zahlreiche, unterschiedliche Differenzierungsmuster der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie Intermediärphänotypen festgestellt werden, die mehrere Zytokine sekretierten (Radenkovic et al. 2016; Walker and von Herrath 2016). So konnte sowohl in Mausmodellen als auch in Typ 1-Patienten ein großer Teil CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert werden, die den Phänotyp follikulärer T-Helferzellen aufwiesen und Interleukin-21 produzierten, jedoch ebenfalls TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  koexprimierten (Kenefeck et al. 2015; Xu et al. 2013). Follikuläre T-Helferzellen aktivieren B-Zellen zur antigenspezifischen Antikörperproduktion (Crotty 2011), weshalb diesem Phänotyp eine besondere Rolle in der Entwicklung der spezifischen Autoantikörper im Diabetes mellitus Typ 1 zugeschrieben wird (Walker and von Herrath 2016). Die Koexpression weiterer Zytokine unterstreicht das breite Spektrum unterschiedlicher CD4<sup>+</sup> T-Zell-Phänotypen (Walker and von Herrath 2016).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzen hinsichtlich ihrer Differenzierungs- und Funktionszustände eine hohe Plastizität und Anpassungsfähigkeit, die es ihnen erlaubt, eine Vielzahl von Funktionen als differenzierte T-Helferzellen zu übernehmen und die im Falle veränderter Bedingungen oder Stimuli einen neuen CD4<sup>+</sup>-Phänotyp annehmen können (DuPage and Bluestone 2016). Inwiefern die erhöhte Blutglukose im diabetischen Geschehen die Differenzierung der T-Zellen beeinflusst, ist nicht eindeutig geklärt (Palmer et al. 2015). Es konnten allerdings zellschädigende Eigenschaften einer chronischen Hyperglykämie auf Immunzellen beschrieben

werden (Von Ah Morano et al. 2020). Während eine kurzzeitige Hyperglykämie eine effiziente Immunantwort bezüglich eines beispielsweise akuten, inflammatorischen Geschehens induziert, gibt es Hinweise darauf, dass eine chronische Hyperglykämie einen glukotoxischen Effekt auf T-Zellen besitzt (Yan 2014; Von Ah Morano et al. 2020). So erhöht Hyperglykämie in T-Zellen den oxidativen Stress und induziert eine übermäßig starke Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Grohova et al. 2019). Diese hemmen den Glukosemetabolismus und aktivieren alternative Stoffwechselwege, welche ebenfalls die ROS-Produktion verstärken können (Grohova et al. 2019). Zusätzlich fördert die Hyperglykämie sowie der erhöhte oxidative Stress die nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren (van Niekerk, Christowitz, et al. 2019). Dabei entstehen Advanced Glycation Endproducts, die durch Akkumulation ebenfalls zur ROS-Produktion beitragen können und die Bildung proinflammatorischer Mediatoren unterstützen, die wiederum weitere inflammatorische Prozesse fördern (van Niekerk, Christowitz, et al. 2019). Die ROS-assoziierten Signalwege sind maßgeblich an der T-Zell-Aktivierung, -differenzierung und -proliferation beteiligt (Geltink, Kyle, and Pearce 2018). Eine übermäßige ROS-Produktion inhibiert allerdings die Aktivität wichtiger Transkriptionsfaktoren wie etwa von Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) sowie die Expression von Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) und c-Myc (Mak et al. 2017). Der Transkriptionsfaktor c-Myc nimmt dabei eine wichtige regulatorische Rolle in der metabolischen Umstrukturierung nach T-Zell-Aktivierung ein (Gnanaprakasam, Sherman, and Wang 2017). Eine Proteomanalyse mit c-Myc-knockout-Mäusen hat jedoch auch gezeigt, dass wichtige, metabolische Schlüsselenzyme auch unabhängig von c-Myc identifiziert werden konnten und dass die komplexen Vorgänge der T-Zell-Aktivierung auf eine große Zahl exprimierter Proteine und induzierter Signalwege beruht und weniger auf einfache An- oder Abschaltung zentraler Transkriptionsfaktoren (Marchingo et al. 2020). Die Analyse unterstrich das Potential von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiv auf Veränderungen mit einer Anpassung ihres Proteoms zu reagieren und betonte die große Relevanz differenzieller Proteomanalysen zum Verständnis komplexer immunologischer Prozesse (Marchingo et al. 2020). So wird der metabolische Phänotyp von T-Zellen nach ihrer Aktivierung durch eine Vielzahl äußerer Stimuli reguliert, wodurch eine Reihe dynamischer Veränderungen hinsichtlich der Transkription und Translation ihrer Proteine hervorgerufen wird (Nyman et al. 2017). Weiterhin wird der metabolische Phänotyp

durch die Verfügbarkeit von Aminosäuren, Sauerstoff oder Glukose beeinflusst, welche so maßgeblichen Einfluss auf die Zell-Funktion haben (Sinclair et al. 2013; Howden et al. 2019). Die Untersuchung des T-Zell-Proteoms ermöglicht daher elementare Einblicke in die umfangreichen Vorgänge der T-Zell-Aktivierung und Proteomgestaltung (Howden et al. 2019). Mithilfe der quantitativen Massenspektrometrie können dabei Proteom-Veränderungen herausgestellt und Prozesse der Protein- und DNA-Synthese, Signalwege und zelluläre Protein-Interaktionsnetzwerke komplex dargestellt werden (Nyman et al. 2017). So bietet die Proteomanalytik von T-Zellen auch in der Diabetesforschung großes Potential für die Untersuchung des Immunrepertoires von T-Zellen sowie deren pathophysiologische Bedeutung (Lepper et al. 2018; Wiles et al. 2019; Hao et al. 2020).



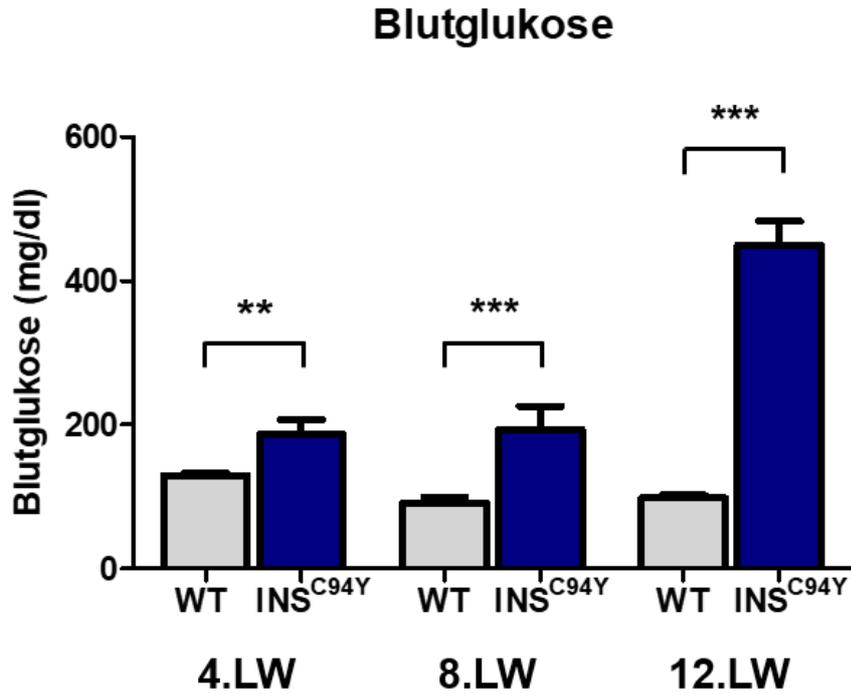
## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blutproben von Wildtyp-Schweinen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen im Alter von 4, 8 und 12 Lebenswochen untersucht. Die  $INS^{C94Y}$  tg Schweine, die das mutierte Insulin C94Y exprimieren, wurden am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München (Prof. Dr. Eckhard Wolf) generiert. Als porzines transgenes Großtiermodell dienen die  $INS^{C94Y}$  tg Schweine als Modell für den permanenten neonatalen Diabetes mellitus (Renner et al. 2013). Die nicht-transgenen Wurfgeschwister (Wildtypen) wurden als Kontrollgruppe zu den  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen verwendet. Dabei wurden Proben von 12 Wildtypen und 10  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in der 4. Lebenswoche, von 14 Wildtypen und 14  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in der 8. Lebenswoche und von 31 Wildtypen und 23  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in der 12. Lebenswoche untersucht. Mittels PCR wurde die Genotypisierung der Schweine kurz nach der Geburt durchgeführt. Bereits in den ersten Lebenstagen entwickelten die  $INS^{C94Y}$  tg Schweine einen diabetischen Phänotyp mit einer persistierenden Hyperglykämie. Die als charakteristisch für den Diabetes mellitus geltenden Störungen der Glukose- und Lipidhomöostase konnten in den  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in Serumproben festgestellt werden. Der altersabhängige Verlauf der Nüchtern-Blutglukose der jeweiligen beprobten Tiere ist in Abbildung 3.1, die Änderungen der Triglyceridwerte in der 4., 8. und 12. Lebenswoche sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Ferkel wurden etwa in der 5. Lebenswoche abgesetzt. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung klinisch gesund. Die Blutprobenentnahme erfolgte an der Vena jugularis der Schweine mittels Lithium-Heparin-Monovetten (9ml)<sup>1</sup>. Je nach Alter und Körpergewicht der Tiere wurden zwischen 8 und 40 ml Blut entnommen.

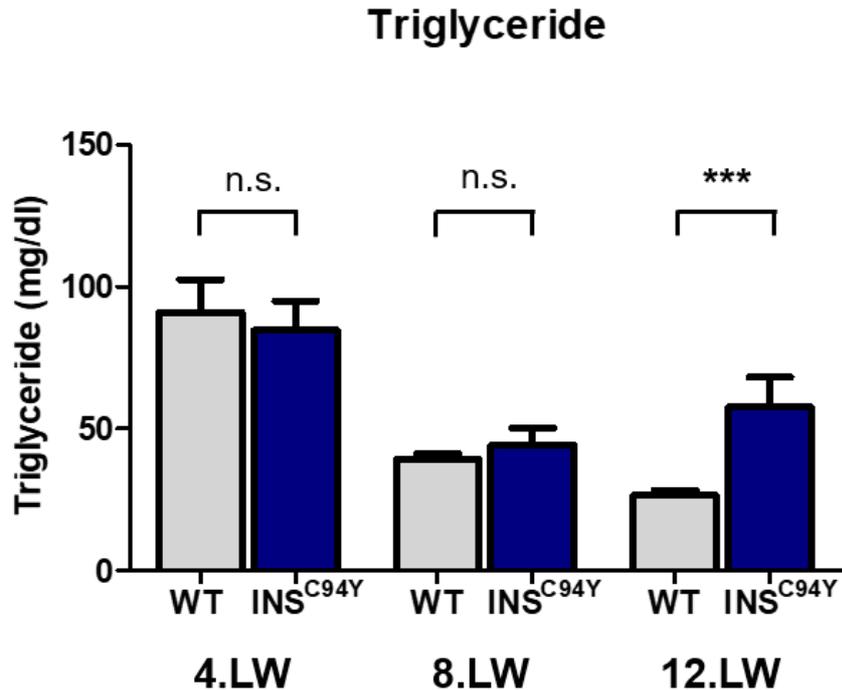
---

<sup>1</sup> Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht



**Abbildung 3.1 Nüchtern-Blutglukose von Wildtyp- und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen im Alter von 4, 8 und 12 Lebenswochen**

Die Abbildung zeigt die Unterschiede zwischen der Nüchtern-Blutglukose der jeweils beprobten Wildtypen (WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine (INS<sup>C94Y</sup>) zum Zeitpunkt der 4.LW (WT n=12; INS<sup>C94Y</sup> n=10), der 8.LW (WT n=14; INS<sup>C94Y</sup> n=14) und der 12.LW (WT n=31; INS<sup>C94Y</sup> n=23). Die Unterschiede der gemessenen Nüchtern-Blutglukosewerte waren zu allen Zeitpunkten signifikant (\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; U-Test).



**Abbildung 3.2 Triglyceridwerte von Wildtyp- und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen im Alter von 4, 8 und 12 Lebenswochen**

Die Abbildung zeigt die Unterschiede zwischen Triglyceridwerten der jeweils beprobten Wildtypen (WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine (INS<sup>C94Y</sup>) zum Zeitpunkt der 4.LW (WT n=12; INS<sup>C94Y</sup> n=10), der 8.LW (WT n=14; INS<sup>C94Y</sup> n=14) und der 12.LW (WT n=31; INS<sup>C94Y</sup> n=23). Die Unterschiede der gemessenen Triglyceridwerte waren in der 12. LW signifikant (\*\*p<0,001, U-Test).

Es wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) der Wildtyp-Schweine und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine in verschiedenen Versuchen eingesetzt.

### Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytenpopulationen

B-Lymphozyten (CD79α<sup>+</sup>)

4.LW: PBMCs von 6 Wildtypen und 8 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

8.LW: PBMCs von 4 Wildtypen und 4 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

12.LW: PBMCs von 7 Wildtypen und 7 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

T-Lymphozyten (CD3ε<sup>+</sup>)

4.LW: PBMCs von 9 Wildtypen und 8 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

8.LW: PBMCs von 10 Wildtypen und 10 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

12.LW: PBMCs von 19 Wildtypen und 17 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

### **Durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen peripherer T-Lymphozyten**

CD4<sup>+</sup>

4.LW: PBMCs von 9 Wildtypen und 8 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

8.LW: PBMCs von 12 Wildtypen und 12 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

12.LW: PBMCs von 19 Wildtypen und 17 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>

4.LW: PBMCs von 8 Wildtypen und 8 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

8.LW: PBMCs von 12 Wildtypen und 12 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

12.LW: PBMCs von 20 Wildtypen und 17 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

CD4<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>

4.LW: PBMCs von 8 Wildtypen und 8 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

8.LW: PBMCs von 7 Wildtypen und 8 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

12.LW: PBMCs von 9 Wildtypen und 10 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

SWC5<sup>+</sup>

4.LW: PBMCs von 4 Wildtypen und 4 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

8.LW: PBMCs von 4 Wildtypen und 4 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

12.LW: PBMCs von 10 Wildtypen und 11 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

### **Untersuchungen zum zellulären Metabolismus der PBMCs**

4.LW: PBMCs von 4 Wildtypen und 6 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

8.LW: PBMCs von 10 Wildtypen und 12 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

12.LW: PBMCs von 15 Wildtypen und 10 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

### **Polyklonale Zellproliferation**

PBMCs von 6 Wildtypen und 6 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

### **Untersuchungen zum zellulären Metabolismus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs von 4 Wildtypen und 4 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

### **CD4<sup>+</sup> T-Zell-Separation und Proteomik**

PBMCs von 5 Wildtypen und 4 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

### **Durchflusszytometrische Analyse von Annexin A1 in porzinen PBMCs**

PBMCs von 11 Wildtypen und 9 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

### **Immunzytochemische Markierung von Annexin A1 in porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs von 1 Wildtyp und 1 INS<sup>C94Y</sup> tg Schwein

### **Durchflusszytometrische Analyse von Annexin A1 in porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (intrazellulär/membrangebunden)**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs von 4/6 Wildtypen und 4/6 INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

## **3.2 Isolierung von PBMCs aus dem peripheren Blut mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation**

### **3.2.1 Puffer und Lösungen**

#### **Trennlösung zur Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Pancoll Trennlösung<sup>2</sup> (Dichte 1,077 g/ml), gebrauchsfertig

#### **Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2**

NaCl <sup>3</sup> (136,9 mM)	8,00 g
KCl (2,6 mM)	0,20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,4 mM)	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (8,1 mM)	1,45 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert auf 7,2 einstellen

#### **RPMI Medium (10% FCS/ 1% Pen/Strep)**

RPMI 1640 Medium mit Glutamin<sup>2</sup>

+ 1% Penicillin/Streptomycin<sup>4</sup> (Pen/Strep)

+ 10% fetales Kälberserum<sup>4</sup> (FCS)

### **3.2.2 Gewinnung der porzinen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)**

Die Blutproben wurden unverdünnt verwendet. Die gesamte Zellpräparation fand unter sterilen Bedingungen statt. Mit einer serologischen Pipette<sup>1</sup> wurden in einem 15 ml

---

<sup>2</sup> PAN-Biotech, Aidenbach

<sup>3</sup> AppliChem, Darmstadt

<sup>4</sup> Biochrom, Berlin

Röhrchen<sup>1</sup> 5 ml Vollblut auf 3 ml Pancoll Trennlösung (Dichte: 1.077 g/ml) geschichtet und anschließend bei 23°C für 25 min zentrifugiert (500 rcf, Bremse ausgeschaltet). Nach erfolgreicher Auftrennung der einzelnen Phasen wurde die zwischen Plasma- und Pancollschicht entstandene Interphase, die aufgrund ihrer Dichte hauptsächlich Lymphozyten sowie eine geringe Zahl von Monozyten (PBMCs) enthält, unter minimaler Aspiration vollständig und möglichst ohne Aspiration der benachbarten Phasen abgenommen und in 30 ml kaltes PBS überführt. Die weitere Präparation erfolgte durchgehend gekühlt bei 4°C. Die isolierten Zellen wurden gewaschen (500 rcf, 10 min, 4°C, Bremse an). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen, das Zellpellet wurde mit frischem PBS resuspendiert und es fand ein weiterer Waschschrift unter gleichen Bedingungen statt. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die gewonnenen PBMCs entweder direkt verwendet oder in RPMI (10% FCS/ 1% Pen/Strep)-Zellkulturmedium resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

### 3.2.3 Zählung der isolierten Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau<sup>5</sup> versetzt (Verdünnung 1:2). 10 µl der Mischung wurden in eine Neubauer-improved Zählkammer<sup>6</sup> (Kammertiefe 0,1 mm) gegeben. Es wurden alle 25 Gruppenquadrate ausgezählt (Fläche pro Gruppenquadrat 0,04 mm<sup>2</sup>).

Zur Berechnung der Zellzahl diente folgende Formel:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]} \cdot \text{Verdünnung}}$$

---

<sup>5</sup> VWR, Darmstadt

<sup>6</sup> NeoLab, Heidelberg

### 3.3 Durchflusszytometrie und Analyse

#### 3.3.1 Puffer und Lösungen

##### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2

(siehe Kapitel 3.2.1)

##### Vitalitätsmarker

Lyophilisiertes Viobility Fixable Dye<sup>9</sup>

in 100µl DMSO lösen und bei -20°C bis zur Verwendung lagern

##### Permeabilisierungspuffer

BD Cytotfix/Cytoperm<sup>7</sup>, gebrauchsfertig

##### Waschpuffer für permeabilisierte Zellen

BD Perm/Wash<sup>7</sup> 5,00 ml

ad 50 ml Aqua bidest.

##### PFA-Fixierlösung 4%

Paraformaldehyd<sup>8</sup> 40,0 g

ad 800 ml 1 x PBS

Eine Stunde bei 60°C rühren und im Eisbad abkühlen lassen.

ad 160 ml 1 x PBS, pH-Wert auf 7,4 einstellen

---

<sup>7</sup> Becton Dickinson, Heidelberg

<sup>8</sup> Merck, Darmstadt

### 3.3.2 Antikörper

Folgende primäre und Fluorochrom-konjugierte Antikörper wurden zur Phänotypisierung der porzinen B- und T-Lymphozyten sowie der Subpopulationen porziner peripherer T-Lymphozyten eingesetzt:

Antikörper + Fluorochrom	Klon	Isotyp	Herkunft	Verdünnung
Anti-human-CD79α	HM57	Maus IgG <sub>1</sub>	Biorad, Feldkirchen	1:100
Anti-human-CD3ε Alexa Fluor 647	CD3-12	Ratte IgG <sub>1</sub>	Dr. E. Kremmer, Helmholtz Zentrum, München	1:200
Anti-Schwein CD4 alpha FITC	MIL17	Maus IgG <sub>2b</sub>	Biorad, Feldkirchen	1:20
Anti-Schwein CD8α Alexa Fluor 647	76-2-11	Maus IgG <sub>2a</sub>	BD, Heidelberg	1:400
Anti-Schwein SWC5	b37c10	Maus IgG <sub>1</sub>	Biorad, Feldkirchen	1:100

Folgende sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

Antikörper + Fluorochrom	Wirtsspezies	Herkunft	Verdünnung
F(ab') <sub>2</sub> anti-Maus IgG(Fc) Alexa Fluor 647	Ziege	Dianova, Hamburg	1:1000

### 3.3.3 Fluoreszenzfärbung von porzinen PBMCs

Mittels Durchflusszytometrie können einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen aufgrund ihrer lichtstreuenden und fluoreszierenden Eigenschaften analysiert und phänotypisiert werden.

Die gewonnenen PBMCs (siehe Kapitel 3.2.2) wurden zunächst abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet für die Vitalitätsbestimmung bis zu einer Gesamtzellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen in 100µl PBS resuspendiert und mit 1µl Viability 405/520

Fixable Dye<sup>9</sup> für 15 min bei Raumtemperatur (RT) und abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Waschpuffer versetzt und gewaschen (4°C, 500 rcf, 10 min). Es folgte das Aussäen der Zellen zu je  $2 \times 10^5$  Zellen in 100 µl PBS pro Delle in eine 96-Loch-Rundbodenplatte<sup>1</sup>. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen (4°C, 800 rcf, 1 min). Für die weiteren Schritte der Fluoreszenzfärbung der Zellen wurde auf Eis gearbeitet. Der Überstand wurde kräftig und vollständig dekantiert und die verbleibenden Zellpellets wurden mit einem der oben aufgelisteten primären Antikörper 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Sollten intrazelluläre Epitope detektiert werden, wurden die Zellpellets zunächst mit 100 µl Permeabilisierungspuffer versetzt und nach einer 20-minütigen Inkubation in zwei Waschschritten mit je 200 µl Waschpuffer für permeabilisierte Zellen gewaschen (4°C, 800 rcf, 1 min). Erst dann erfolgte bei diesen Zellen die Inkubation des primären Antikörpers sowie das zweimalige Waschen mit PBS. Im Anschluss folgte eine 30-minütige Inkubation des jeweiligen sekundären Antikörpers, sofern zuvor ein unkonjugierter, primärer Antikörper verwendet wurde, sowie zwei erneute Waschschriffe mit PBS. Ab dem Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden die Inkubationsschritte abgedunkelt durchgeführt. Abschließend konnten die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden.

### **3.3.4 Detektion gefärbter Zellen mit dem Durchflusszytometer**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die durchflusszytometrischen Untersuchungen ein MACSQuant Analyzer 10<sup>9</sup> verwendet.

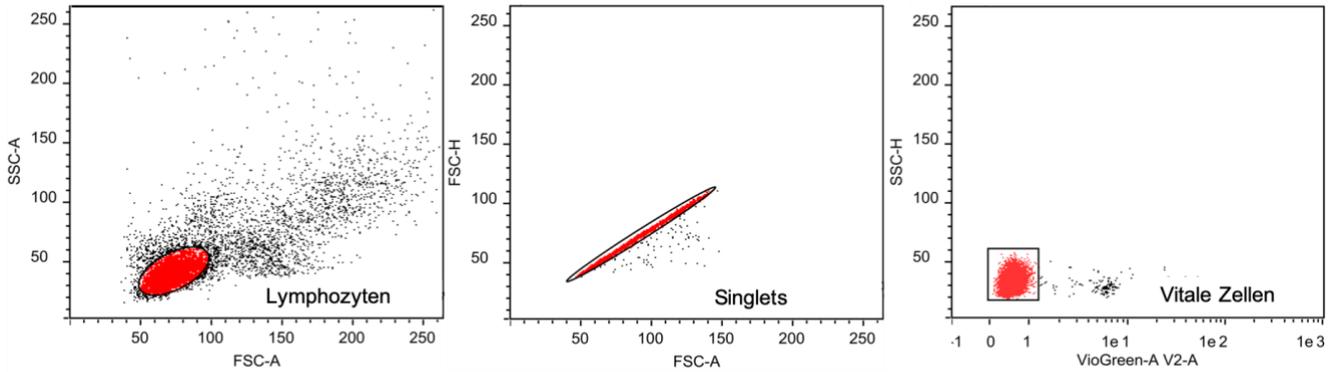
Mithilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) kann die Proteinexpression von einzelnen Zellen und Zellpopulationen, die vorher mit einem Fluorochrom-markierten Antigen-spezifischen Antikörper gefärbt wurden, quantitativ bestimmt werden. Der Prozentsatz der Zellen, die dieses Antigen exprimieren, beziehungsweise die Expressionsstärke dieses Antigens, kann somit für die getesteten Zellen ermittelt werden. Durch Mehrfachfärbungen mit weiteren Fluorochrom-markierten Leukozytendifferenzierungsmarkern können unter anderem Lymphozytenpopulationen beziehungsweise -subpopulationen analysiert und genauer phänotypisiert werden.

---

<sup>9</sup> Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### 3.3.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mithilfe der Flowlogic Software<sup>9</sup>. Die angewendete Gating Strategie ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Zunächst wurden alle gemessenen Zellen durch Auftragen der Forward-Scatter-Fläche (FSC-A, Größe) gegen die Side-Scatter-Fläche (SSC-A, Granularität) im Dotplot sichtbar gemacht. Zur Beurteilung der prozentualen Anteile von Lymphozyten und T-Zell-Subpopulationen wurde die Lymphozytenpopulation durch das Einzeichnen eines Lymphozyten-Gates zur weiteren Analyse festgelegt (Lymphozyten). Die in diesem Gate befindlichen Zellen wurden anschließend in der Forward Scatter-Fläche (FSC-A) gegen die Höhe (FSC-A) dargestellt, um zu gewährleisten, dass lediglich einzelne Zellen detektiert werden (Singlets). Aus diesem Gate heraus konnten, durch die anfangs durchgeführte Markierung mit Viobility, wiederum die Zellen aussortiert werden, die aufgrund einer nicht intakten Zellmembran durch Viobility im Zellinneren positiv markiert und somit als tote Zellen identifiziert wurden. Zur Auswertung der anschließenden Phänotypisierung der Lymphozyten und T-Zell-Subpopulationen wurden ausschließlich die Zellen herangezogen, die keine Viobility-Färbung angenommen hatten (Vitale Zellen). Dabei wurden Einzelfärbungen mithilfe eines Histogramms und Doppelfärbungen mithilfe eines Dotplots ausgewertet. Anhand des Histogramms, in dem eine Trennlinie den Graphen in zwei Bereiche teilt, lässt sich eine positive Fluorochrom-markierte Population auf der rechten Seite von einer nicht-Fluorochrom-markierten Population auf der linken Seite unterscheiden. Im Dotplot wurden vier Quadranten ausgewertet, wobei doppelt positive, d.h. mit beiden eingesetzten Antikörpern angefärbte, Zellpopulationen im rechten oberen Quadranten dargestellt werden. Für die positive Population wurden die Werte des prozentualen Anteils (parent) aller Zellen, bei denen eine Antikörper-Bindung detektiert wurde, im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ermittelt.



**Abbildung 3.3 Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse porciner PBMCs**

Die Grafik zeigt exemplarisch die Gating-Strategie mit der PBMCs von Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen analysiert wurden. In der linken Abbildung sind alle Zellen im FSC-A/SSC-A-Dotplot dargestellt. Lymphozyten wurden rot eingegrenzt und im nächsten Plot aufgetragen. Einzelne Zellen zeichnen sich durch einen linearen Zusammenhang zwischen FSC-A/-H aus und wurden wiederum ausgewählt (mittlere Abbildung). Nach Prüfung der Vitalität wurden nur Zellen für weitere Analyseschritte herangezogen, die nicht mit Viability angefärbt wurden (rechter Dotplot).

### 3.3.6 Statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Es sollte geprüft werden, ob sich der prozentuale Anteil von Lymphozyten und der Anteil von T-Zell-Subpopulationen innerhalb der PBMCs zwischen  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen und Wildtypen in der 4., 8. und 12. Lebenswoche unterscheidet. Hierzu wurden für die statistische Auswertung die jeweiligen positiven Prozentsätze der entsprechenden Zellpopulationen  $CD3\epsilon^+$ ,  $CD79\alpha^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8\alpha^+$ ,  $CD4^+CD8\alpha^+$  und  $SWC5^+$  in den PBMCs der beiden Phänotypen zu den jeweiligen Zeitpunkten bestimmt. Anschließend wurden die ermittelten prozentualen Anteile (parent) pro Tier zwischen Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen mittels eines Kolmogorov-Smirnov Tests (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS:  $\geq 0,05$ ) wurde der Student's  $t$ -Test zur Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten (KS:  $\leq 0,05$ ) fand der Mann-Whitney-U-Test Verwendung. In beiden Tests wurden Unterschiede zwischen den Phänotypen mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

## 3.4 Untersuchungen zum zellulären Metabolismus porziner PBMCs

### 3.4.1 Puffer und Lösungen

#### Poly-D-Lysin-Lösung für das Adhärenzieren der Zellen in XF24-Loch-Platten

Poly-D-Lysin<sup>8</sup> 5 mg

ad 100 ml Aqua bidest.

#### XF-Kalibrierungspuffer

Seahorse XF Calibrant Solution<sup>10</sup>, gebrauchsfertig

#### Seahorse XF Medium, pH 7,4

Seahorse XF RPMI Medium (ohne Phenolrot)<sup>10</sup> 50 ml

2,5 M Glukose<sup>8</sup> 200 µl

0,2 mM L-Glutamin solution<sup>8</sup> 500 µl

0,1 mM Pyruvat<sup>8</sup> 500 µl

Puffer auf pH 7,4 einstellen; anschließend mittels Sterilfilter<sup>11</sup> (Porengröße 0,22 µm) steril filtrieren und bei 37°C im Wärmebad bis zum Experiment bereitstellen

### 3.4.2 Reagenzien: Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit<sup>10</sup>

#### Substanz zur Hemmung der ATP-Synthase

Oligomycin, gebrauchsfertig (63 nmol)

ad 630 µl Seahorse XF Medium (pH 7,4) für eine 100 µM Stammlösung; für die Gebrauchslösung werden 300 µl der Stammlösung mit 2700 µl Medium verdünnt

---

<sup>10</sup> Agilent Technologies, Waldbronn

<sup>11</sup> Spicker, Waldmünchen

**Substanz zur Entkopplung der Atmungskette durch Abbau des mitochondrialen Membranpotentials:**

Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon, FCCP, gebrauchsfertig (72 nmol)

ad 720 µl Seahorse XF Medium (pH 7,4) für eine 100 µM Stammlösung; für die Gebrauchslösung werden 300 µl der Stammlösung mit 2700 µl Medium verdünnt

**Substanz zur Hemmung der Komplexe I und III der Atmungskette:**

Rotenon und Antimycin A, gebrauchsfertig (je 27 nmol)

ad 540 µl Seahorse XF Medium (pH 7,4) für eine 50 µM Stammlösung; für die Gebrauchslösung werden 300 µl der Stammlösung mit 2700 µl Medium verdünnt

**3.4.3 Messverfahren mittels Seahorse XFe24 Analyzer**

Mithilfe des Seahorse XFe24 Analyzers<sup>10</sup> wurde das metabolische Potential von porzinen Wildtyp-PBMCs und diabetischen PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen untersucht. Durch die Messung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen während der Zellatmung sowie der Azidifizierung des Mediums durch freie Protonen aus der Glykolyse können die Hauptenergiegewinnungswege der Zellen mittels einer nicht-invasiven Methode analysiert werden. Unter Verwendung verschiedener Substanzen, wie beispielsweise dem Ionophor FCCP oder den Inhibitoren Oligomycin, Rotenon und Antimycin A, können darüber hinaus Komplexe der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung moduliert und die daraus resultierende Änderung der Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen (Oxygen Consumption Rate, OCR) sowie die Azidifizierungsrate des Mediums (Extracellular Acidification Rate; ECAR) in Echtzeit gemessen werden. Zwei voneinander unabhängige Fluorophore messen dabei die Sauerstoffkonzentration und die Änderung des pH-Wertes durch freie Protonen im XF Medium. Die Stärke des Fluoreszenzsignals für Sauerstoff lässt somit Rückschlüsse auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen zu, der durch die Reduzierung von Sauerstoff zu Wasser während der mitochondrialen Respiration auftritt. Ein Absinken des pH-Wertes, durch eine Ansäuerung des Mediums, kann vorwiegend mit einer Laktatproduktion in der Folge einer glykolytischen Energiegewinnung der Zellen assoziiert werden (van der Windt, Chang, and Pearce 2016).

### 3.4.4 Vorbereitungen der Messung

Am Vortag des Experiments wurden die Dellen von XF24-Loch-Platten<sup>10</sup> mittels einer Poly-D-Lysin-Lösung beschichtet, um eine bessere Haftung der PBMCs am Boden der Platten zu erzielen. Unter sterilen Bedingungen wurde in jede der 24 Dellen 52 µl der verdünnten Poly-D-Lysin Lösung pipettiert und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der überstehenden Poly-D-Lysin Lösung ohne Bodenkontakt und Spülen der 24 Dellen mit sterilem Wasser, trockneten die Platten für 30 min unter der sterilen Werkbank. Bis zu ihrer Verwendung konnten die sterilen Platten bei 4°C gelagert werden. Am Versuchstag wurden sie 1 h vor Beginn des Experiments in einem Wärmeschrank (37°C, ohne CO<sub>2</sub>-Begasung) erwärmt.

Ebenfalls am Vortag erfolgte die Vorbereitung der XFe24-Sensor-Platte<sup>10</sup>. Pro Delle wurden 1000 µl des XF-Kalibrierungspuffers pipettiert und über Nacht in einer Feuchtkammer im Wärmeschrank (37°C, ohne CO<sub>2</sub>) äquilibriert. Für eine konstante Temperatur von 37°C wurde der Seahorse XFe24 Analyzer am Vorabend oder mindestens 5 h vor Messung eingeschaltet.

### 3.4.5 Simultane Messungen von OCR und ECAR

Für die Untersuchung metabolischer Eigenschaften wurden PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe Kapitel 3.2.2).

Pro Delle einer vorgewärmten XF24-Loch-Platte wurden  $1 \times 10^6$  PBMCs in 200 µl warmen XF-Medium in Duplikaten ausgesät. Für die Bestimmung des Leerwertes verblieben vier Dellen der XF24-Loch-Platten zellfrei mit dem gleichen Volumen XF-Medium. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (800rcf, 23°C, 1min). Dabei wurde für ein gleichmäßiges Anhaften der Zellen am Boden auf die Bremsfunktion verzichtet. Im Anschluss wurden alle Dellen auf ein Volumen von 500 µl mit XF-Medium aufgefüllt. Bis zum Start der Messung wurde die Platte für etwa 20 min in einen Wärmeschrank bei 37°C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung gelagert.

Mithilfe des Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kits<sup>10</sup>, welches sowohl Inhibitoren der Atmungskette wie Oligomycin, Rotenon und Antimycin A (Rot/AA) als auch Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon (FCCP), einen Entkoppler der Atmungskette, beinhaltet, können Modulationen der mitochondrialen Respiration und glykolytischen Aktivität induziert und folglich Änderungen in der OCR und ECAR bestimmt werden.

Die Reagenzien des Kits wurden nach Empfehlung des Herstellers verdünnt (siehe Kapitel 3.4.2). Anschließend wurden die Vertiefungen (Ports) der XFe24-Sensor-Platte mit diesen Reagenzien befüllt:

Port A: Oligomycin: 56 µl; für eine Endkonzentration von 1 µM pro Delle

Port B: FCCP: 62 µl; für eine Endkonzentration von 1 µM pro Delle

Port C: Rot/AA: 69 µl; für eine Endkonzentration von 0,5 µM pro Delle

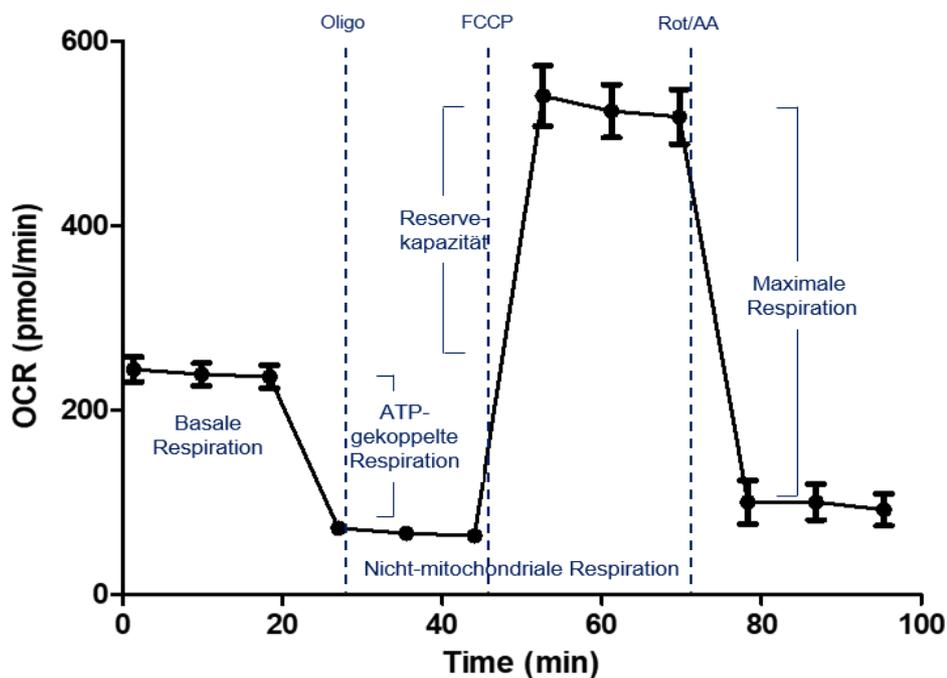
Nach Einstellung des Messprotokolls, welches mittels der Agilent Wave Software<sup>10</sup> erstellt wurde, konnte die Messung gestartet werden. Die befüllte XFe24-Sensor-Platte wurde zur Kalibrierung in das Gerät gelegt. Nach erfolgreicher Kalibrierung folgte das Einlegen der XF24-Loch-Platte mit den enthaltenen PBMCs.

### 3.4.6 Auswertung der Messergebnisse

Es sollten folgende Parameter der porzinen PBMCs während des Experiments durch Messung der OCR bestimmt werden: Basale Respiration, ATP-gekoppelte Respiration, Reservekapazität, nicht-mitochondriale Respiration und maximale Respiration. Simultan wurde durch Bestimmung der ECAR die basale glykolytische Aktivität sowie die Azidifizierungsraten des Mediums nach Zugabe der jeweiligen Modulatoren bestimmt. Die Daten der Stoffwechselfmessungen wurden in der mit dem Gerät gekoppelten Wave Software<sup>10</sup> analysiert.

Abbildung 3.4 zeigt einen typischen Messverlauf der OCR im Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Da dem Medium für dieses Assay Pyruvat, Glukose und Glutamin zugesetzt wird, können die Zellen alle Stoffwechselwege nutzen, um Energie in Form von ATP zu generieren. Im ersten Messzyklus (0-18.min) wird die basale Respiration der Zellen bestimmt, d.h. wie viel Sauerstoff durch die mitochondriale Respiration verbraucht wird, um den Energieerhaltungsbedarf der Zelle zu decken. Im nächsten Messzyklus (27.- 44.min) wird durch Zugabe des Inhibitors Oligomycin (Oligo) die ATP-gekoppelte Respiration gemessen. Sie kann als Differenz aus basaler OCR und OCR nach Oligomycin-Injektion bestimmt werden. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette), indem es durch Bindung an den Protonenkanal diesen blockiert und damit die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP hemmt. Die ATP-gekoppelte Respiration gibt demnach an, wie viel Sauerstoff für die ATP-Generierung genutzt wird. Sie kann je nach Aktivierungszustand und

Energiebedarf der Zelle sowie Substratverfügbarkeit variabel sein (Divakaruni et al. 2014). Nach Injektion des Ionophors Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) im nächsten Messzyklus (53.-70.min) wird der Protonengradient entkoppelt. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen erreicht hier sein Maximum. Es kann folglich die maximal respiratorische Leistung (Maximale Respiration) der Zellen gemessen werden, die die Zellen aufbringen könnten, um auf einen maximal gesteigerten Energiebedarf zu reagieren. Die Differenz aus maximaler Respiration und basaler Respiration ist die Reservekapazität der Zellen. Im letzten Messzyklus (78.-95.min) werden durch Zugabe zweier weiterer Inhibitoren Rotenon (Rot) und Antimycin A (AA) die Komplexe I und III der Atmungskette gehemmt und der Elektronentransport an der inneren Mitochondrienmembran unterbrochen. Auch hierbei sinkt der Sauerstoffverbrauch der Zellen, die OCR reduziert sich.



**Abbildung 3.4 Assayparameter zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) in PBMCs**

Bestimmt werden folgende Parameter: Basale Respiration, ATP-gekoppelte Respiration, Reservekapazität, nicht-mitochondriale Respiration und maximale Respiration. Durch die Zugabe von Modulatoren können Aussagen zur metabolischen Leistung der Zellen gemacht werden. Oligomycin (Oligo) inhibiert die ATP-Synthase, wodurch der Sauerstoffverbrauch der Zellen gemindert und kein ATP im Mitochondrium generiert wird. Durch Zugabe von Carbonylcyanid-4-phenylhydrazone (FCCP) wird die Elektronentransportkette entkoppelt, der Sauerstoffverbrauch der Zellen wird maximiert. Rotenon (Rot) und Antimycin A (AA) hemmen die Komplexe I und III der Atmungskette, der Sauerstoffverbrauch der Zellen sinkt abermals.

Simultan zur Änderung des Sauerstoffverbrauchs wurde im Seahorse XFe24 Analyzer die Azidifizierungsrate des Mediums (ECAR) der porzinen PBMCs gemessen, über die eine indirekte Aussage zum glykolytischen Potential der Zellen möglich ist (Divakaruni et al. 2014). Durch die Modulation der mitochondrialen Komplexe der Atmungskette oder der ATP-Synthase ist die Zelle dazu gezwungen über alternative Stoffwechselwege ATP zu generieren. Während der Glykolyse, die im Zytosol der Zelle stattfindet, werden Wasserstoffionen ( $H^+$ ) durch die Vergärung von Pyruvat zu Laktat freigesetzt, die das umgebende Medium ansäuern und den pH-Wert senken. Durch die Hemmung der mitochondrialen Respiration bei Injektion von Oligomycin, Rotenon und Antimycin A steigt demzufolge die Azidifizierung des Mediums durch Umstellung des Stoffwechsels. Nach Injektion von FCCP wird der in der Mitochondrienmembran herrschende Protonengradient entkoppelt, eine ATP-Synthase bleibt jedoch aus, wodurch auch hierbei die Zellen eine höhere glykolytische Aktivität aufweisen.

### 3.4.7 Statistische Auswertung

Die Daten der Stoffwechselfmessungen wurden in der Wave Software analysiert. Die gemessenen Werte wurden dafür zunächst normalisiert, indem alle Werte auf eine Zellzahl von insgesamt  $1 \times 10^5$  Zellen angepasst wurden. Für die statistische Auswertung wurden jeweils aus den Messergebnissen der PBMCs aus Wildtypen und aus  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen Mittelwerte pro Messzeitpunkt gebildet. Somit konnten Änderungen der OCR und der ECAR unter Basalbedingungen und nach Oligomycin-, FCCP- und Rot/AA-Injektion zwischen den Phänotypen verglichen werden. Die Mittelwerte pro Messzeitpunkt der Wildtyp-PBMCs und der PBMCs aus  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov Test (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS:  $\geq 0,05$ ) wurde der Student's  $t$ -Test zur Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten (KS:  $\leq 0,05$ ) fand der Mann-Whitney-U-Test Verwendung. In beiden Tests wurden Unterschiede zwischen den Phänotypen mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

### 3.5 Lymphozytenproliferation

#### 3.5.1 Puffer und Lösungen

##### RPMI Medium (10% FCS/ 1% Pen/Strep)

(siehe Kapitel 3.2.1)

##### [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Lösung (0,05 mCi/ml)

[Methyl-<sup>3</sup>H] Thymidin<sup>12</sup> (1.0 mCi/ml) 0,50 ml

ad 10 ml RPMI 1640 Medium mit Glutamin<sup>2</sup>

#### 3.5.2 *In vitro* Stimulation und radioaktive Markierung der porzinen Lymphozyten

Es wurde der Einfluss verschiedener Stimulantien auf die Zellproliferationsrate von porzinen Lymphozyten aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in einem <sup>3</sup>H-Thymidin-Assay getestet. Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

PBMCs von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen wurden, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, isoliert und in RPMI Medium (10% FCS/ 1% Pen/Strep) auf eine Dichte von  $5 \times 10^5$ /ml eingestellt. Die Zell-Suspension wurde anschließend mit  $1 \times 10^5$  Zellen in je 200 µl RPMI Medium in die Dellen einer sterilen 96-Flachboden Lochplatte<sup>1</sup> in Duplikaten ausgesät. Ein Duplikat blieb dabei pro Ansatz als Mediumkontrolle unstimuliert. Die restlichen Duplikate wurden mit Mitogenen stimuliert, die die Lymphozytenproliferation induzierten:

Stimulanz	Endkonzentration
Concanavalin A (ConA) <sup>8</sup>	1 µg/ml

---

<sup>12</sup> Perkin Elmer, Hamburg

Phytohämagglutinin (PHA) <sup>8</sup>	1 µg/ml
Pokeweed Mitogen (PWM) <sup>8</sup>	1 µg/ml
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) <sup>8</sup>	1 µg/ml
<i>Musa paradisiaca</i> (banana) Lektin (BanLec) <sup>13</sup> .	1 µg/ml

Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% für 32 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µl einer radioaktivem [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Lösung pro Delle (1 µCi/Kavität) versetzt und weitere 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Harvester<sup>14</sup> geerntet. Die Zellen wurden in einem Glasfaserfilter<sup>15</sup> aufgefangen, welcher bei 80°C im Trockenschrank für 30 min getrocknet wurde. Der Glasfaserfilter wurde in Omni Filterkassetten<sup>16</sup> eingespannt, mit 20 µl Szintillationsflüssigkeit<sup>17</sup> pro Kavität versetzt und die Filterkassetten wurden mit einer selbstklebenden Folie versiegelt. Anschließend erfolgte die [<sup>3</sup>H]-Aktivitäts-Messung. Es konnte dabei die Proliferationsrate der Zellen durch den Einbau des radioaktiven Nukleotids <sup>3</sup>H-Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA mithilfe eines Beta Counters (TopCount NXT Microplate)<sup>18</sup> in counts per minute (cpm) gemessen werden.

### 3.5.3 Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten

Für die statistische Auswertung der Zellproliferationsraten wurden aus den cpm-Werten zunächst Proliferationsindizes berechnet. Dafür wurden die cpm-Werte der stimulierten Zellen jedes Tieres durch die Werte der unstimulierten Zellen desselben Tieres dividiert. Der Proliferationsfaktor für die unstimulierten Ansätze betrug 1. Anhand der Proliferationsindizes konnten Unterschiede in den Proliferationsraten der Lymphozyten zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen verglichen werden. Die ermittelten Proliferationsindizes wurden zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg

<sup>13</sup> LINARIS, Dossenheim

<sup>14</sup> Packard, Dreieich

<sup>15</sup> Perkin Elmer, Hamburg

<sup>16</sup> Packard, Dreieich

<sup>17</sup> Perbio Science, Bonn

<sup>18</sup> Packard, Dreieich

Schweinen mittels eines Kolmogorov-Smirnov Tests (KS) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung (KS:  $\geq 0,05$ ) wurde der Student's *t*-Test zur Auswertung herangezogen. Bei nicht normalverteilten Werten (KS:  $\leq 0,05$ ) fand der Mann-Whitney-U-Test Verwendung. In beiden Tests wurden Unterschiede zwischen den Phänotypen mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

### 3.6 Magnetische Zellseparation

#### 3.6.1 Puffer und Materialien

##### MACS Puffer

PBS pH 7,2	100 ml
0,5% BSA	0,5 g BSA
0,5 M EDTA	400 $\mu$ l

##### MACS Puffer ohne BSA

PBS pH 7,2	100 ml
0,5 M EDTA	400 $\mu$ l

##### Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft	Verdünnung
Anti-Schwein CD4 alpha	MIL17	Maus IgG <sub>2b</sub>	Biorad, Feldkirchen	1:50

##### Magnetische Partikel

anti-Maus IgG<sub>2a+b</sub> MicroBeads<sup>9</sup>

### 3.6.2 Gewinnung von positiv selektierten porcinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Periphere CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen wurden im Rahmen dieser Arbeit metabolisch charakterisiert sowie massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden zunächst PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe Kapitel 3.2.2). Anschließend sollten aus dem heterogenen Zellgemisch CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die MACS-Technologie (Magnetic Activated Cell Sorting)<sup>9</sup> positiv selektiert werden. Dieses Verfahren beruht auf der spezifischen Markierung von Zielzellen mittels Antikörper und magnetischen Partikeln, den sogenannten MicroBeads<sup>9</sup>. Die hierdurch positiv markierten Zellen werden durch ein starkes Magnetfeld geführt, in dem sie zunächst zurückgehalten und von unmarkierten Zellen getrennt werden. Diese passieren ungehindert die Säule. Nach Entfernung des Magnetfeldes können die positiv markierten Zellen gewonnen werden. PBMCs von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen wurden auf eine Dichte von  $6 \times 10^7$ /ml eingestellt und abzentrifugiert, um die Zellen anschließend in 6 ml MACS Puffer zu waschen (4°C, 500 rcf, 10 min). Das Zellpellet wurde in 980 µl MACS Puffer resuspendiert und mit 20 µl eines anti-Schwein CD4-Antikörpers (Isotyp Maus IgG<sub>2b</sub>) für 20 min auf Eis inkubiert (Verdünnung 1:50). Es folgte ein weiterer Waschschrift in 6 ml MACS Puffer. Anschließend wurde das Zellpellet in 480 µl MACS Puffer resuspendiert und isotypspezifisch mit 120 µl anti-Maus IgG<sub>2a+b</sub> MicroBeads<sup>9</sup> für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden nun zur Schonung der Bindung von Antikörper und MicroBeads in 6 ml MACS Puffer bei 300 rcf und 4°C für 10 min zentrifugiert. Parallel dazu wurden die MACS Separationssäulen<sup>9</sup> ins Magnetfeld verbracht und mit MACS Puffer äquilibriert, um die magnetische Separation vorzubereiten. Das verbleibende Zellpellet wurde in 500 µl MACS Puffer aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Die nicht markierten Zellen wurden als Durchlauf asserviert. Es folgte ein dreimaliges Spülen der Säule mit MACS Puffer, wobei auch dieser Durchlauf als Negativfraktion asserviert wurde. Nach Entfernung der Säule vom Magnetfeld wurden die positiv selektierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mithilfe eines Stempels aus der Säule herausgespült und anschließend abzentrifugiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die gewonnenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBS resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Für die massenspektrometrische Analyse wurde das Zellpellet nach Inkubation des Antikörpers und der MicroBeads in MACS Puffer ohne BSA-Zusatz aufgenommen. Im

Weiteren wurden die Schritte der magnetischen Separation mit MACS Puffer ohne BSA durchgeführt. Nach Separation der positiven CD4<sup>+</sup>-Fraktion erfolgten zwei weitere Waschschrte in MACS Puffer ohne BSA.

### 3.7 Massenspektrometrische Analyse mittels DIA LS-MS/MS

Zur differenziellen Proteomanalyse wurden mittels Liquid-Chromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) neun Zellfraktionen peripherer CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus fünf Wildtypen und vier INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen massenspektrometrisch analysiert. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zuvor durch die MACS-Technologie aus PBMCs mithilfe eines anti-CD4-Antikörpers und magnetischen Partikeln positiv selektiert (siehe Kapitel 3.6.2). Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit datenunabhängiger Erfassung (DIA).

#### 3.7.1 FASP Verdau der Zellfraktionen

##### 3.7.1.1 Puffer und Lösungen

###### 1 M Dithiothreitol (DTT)

DTT<sup>8</sup> (1 M) 15,42 mg

In 1 ml HPLC Wasser<sup>8</sup> lösen

###### Urea A-Puffer (UA)

Harnstoff<sup>8</sup> (8 M) 48,03 mg

1 M Tris-HCl pH 8,5 (100 mM) 100 µl

Ad 1 ml HPLC Wasser<sup>8</sup>

###### 300 mM Iodacetamid

2-Iodacetamid<sup>8</sup> (300 mM) 55,4 mg

In 1 ml HPLC Wasser<sup>8</sup> lösen

### **Ammoniumbicarbonat (ABC) -Puffer**

ABC<sup>8</sup> (50 mM) 19,75 mg

In 5 ml HPLC Wasser<sup>8</sup> lösen

### **Lys-C**

Lysyl Endopeptidase<sup>19</sup> (0,5 mg/ml) 20 µg

In 40 µl ABC lösen

### **Trypsin**

Trypsin<sup>20</sup> (1 mg/ml) 20 µg

In 20 µl ABC lösen

### **5% Acetonitril (ACN)**

Acetonitril<sup>8</sup> 5% 50 µl

Ad 1 ml ABC

### **Trifluoressigsäure<sup>8</sup> (TFA)**

#### **3.7.1.2 Durchführung des FASP Verdau der porzinen CD4<sup>+</sup> Proben**

Zum Einsatz kamen pro CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion  $6 \times 10^5$  Zellen. Zur Vorbereitung auf ihre massenspektrometrische Analyse wurde eine Proteinmenge von 10 µg pro Probe einem „Filter-aided Sample Preparation“ (FASP)-Verdau unterzogen (Wisniewski 2018). Dazu wurden die Eluate auf ein Gesamtvolumen von 400 µl mit ABC verdünnt. Es folgte eine Zugabe von 1 µl 1 M DTT und eine 30-minütige Inkubation bei 60 °C auf

---

<sup>19</sup> Wako, Neuss

<sup>20</sup> Promega, Mannheim

dem Schüttler (500 rpm). Die Proben wurden anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, mit je 600 µl UA verdünnt und mit 10 µl 300 mM Iodacetamid für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um anschließend nochmals 2 µl 1 M DTT zuzusetzen. Die Cut-off-Filter (Vivacon 500<sup>21</sup> 30 kDa) wurden mit je 200 µl ABC vorgewaschen (15.000 rcf, 15 min, RT). Die Proben wurden auf die angefeuchteten Filter übertragen und abzentrifugiert (15.000 rcf, 15 min, RT). Die Durchläufe wurden verworfen. Die Filter wurden anschließend dreimal mit 200 µl UA und dreimal mit 100 µl 50 mM ABC gewaschen, woraufhin die Durchläufe ebenfalls verworfen wurden. Es folgte eine Zugabe von je 40 µl ABC-Puffer sowie 1 µl Lys-C und nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur von 1 µl Trypsin und 10 µl ABC-Puffer. Die Filter wurden mit Parafilm abgedeckt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filter für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 15.000 rcf zentrifugiert. Der Peptide enthaltende Durchlauf wurde asserviert (Durchlauf 1). Es wurden 20 µl 5% ACN auf die Filter gegeben, um die Filter anschließend erneut abzuzentrifugieren (15.000 rcf, 15 min, RT). Der 2. Durchlauf wurde ebenfalls asserviert und mit Durchlauf 1 zusammengeführt. Für die Einstellung von pH2 wurden die so gewonnenen Eluate, nach Bedarf, mit TFA angesäuert und bis zur Analyse mittels LC-MS/MS bei -20°C aufbewahrt.

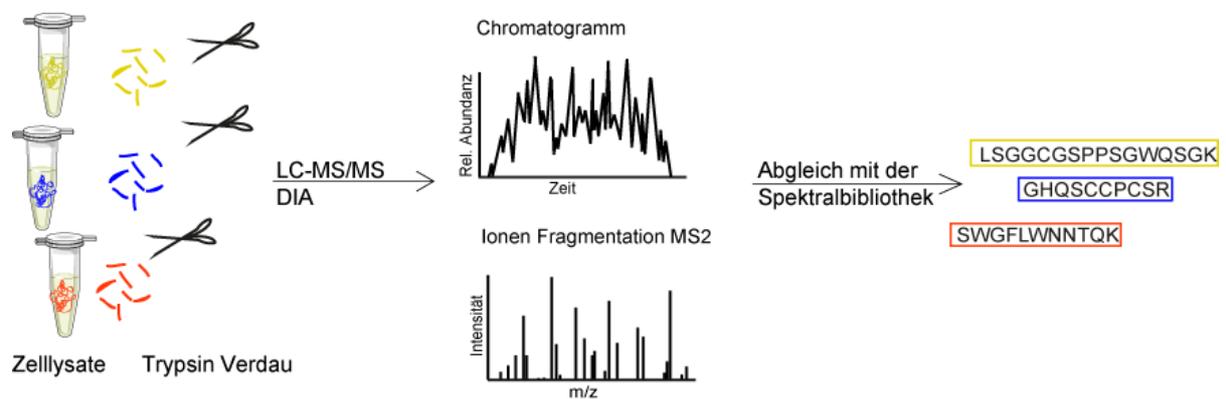


Abbildung 3.5 Workflow des Proteinverdaus sowie der massenspektrometrischen Analyse

<sup>21</sup> Sartorius, Göttingen

## 3.7.2 LC-MS/MS

### 3.7.2.1 Puffer und Lösungen

#### Puffer A

Acetonitril <sup>8</sup> 2%	20 ml
Ameisensäure <sup>8</sup> 0,1%	1 ml
Ad 1 l HPLC Wasser <sup>8</sup>	

#### Puffer B

Acetonitril <sup>8</sup> 98%	980 ml
Ameisensäure <sup>8</sup> 0,1%	1 ml
Ad 1 l HPLC Wasser <sup>8</sup>	

### 3.7.2.2 Durchführung der massenspektrometrischen Analyse

Die LC-MS/MS-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit der Research Unit Protein Science des Helmholtz Zentrums München unter der Leitung von Frau Dr. Stefanie Hauck durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem Q Exactive HF Massenspektrometer<sup>22</sup>, welches mit einer Nano Spray Ionenquelle online an ein Ultimate 3000 nano RSLC System gekoppelt ist. Für die chromatographische Auftrennung wurden die verdauten Peptide zunächst automatisch auf eine Fangsäule<sup>23</sup> geladen (300 µm ID x 5 mm, gepackt mit Acclaim PepMap 100 C18, 5 µm, 100 Å Material). Die Peptide wurden eluiert und anschließend auf der analytischen Säule<sup>24</sup> aufgetrennt (nanoEase MZ HSS T3 Column, 100 Å, 1,8 µm, 75 µm ID x 250 mm). Die Auftrennung erfolgte durch die Zusammensetzung von Puffer A und Puffer B in einem ACN Gradienten von 3% bis 40% bei einer Flussrate von 250 nl/min in einem Zeitraum

---

<sup>22</sup> Thermo Fisher Scientific, Ulm

<sup>23</sup> LC Packings, Sunnyvale, USA

<sup>24</sup> Waters, Milford, USA

von 105 Minuten. Mit einer Auflösung von 120.000 und einer maximalen Injektionszeit von 120 ms wurden die MS1 Spektren der Vorläuferpeptide von 300 bis 1650 m/z aufgezeichnet, um einen AGC-Wert (Automatic Gain Control) von  $3e6$  zu erreichen. Es wurden alle Peptidionen aus den MS1 Vorscans für die Fragmentanalyse ausgewählt (datenunabhängige Erfassung (DIA)). Die Fragmentspektren wurden in 37 überlappenden DIA-Isolationsfenstern variabler Größe aufgezeichnet, sodass diese insgesamt eine Massenbreite von 300 bis 1650 m/z mit einer Auflösung von 30.000 abdeckten. Der Wert für die normalisierte Kollisionsenergie wurde auf 27 festgesetzt.

### 3.7.3 Abgleich mit der Spektralbibliothek und quantitative Analyse

Die gewonnenen Spektren wurden mithilfe der Spectronaut Software (Version 12)<sup>25</sup> analysiert. Dazu erfolgte ein Abgleich der aufgenommenen MS/MS-Spektren mit einer in-house Schweine-Spektralbibliothek, die zuvor mit der Spectronaut 12 Software und der Ensembl Schweine Datenbank (Release 75, Sscrofa10.2, <http://www.ensembl.org>) generiert wurde. Die Falschpositivrate (*engl.* false discovery rate, FDR) wurde für die Peptididentifikation auf  $< 1\%$  festgelegt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der MS2 Fragmentspektren, wobei nur Precursor Signale mit einem  $q < 0,01$  in mindestens 20% aller Proben berücksichtigt wurden. Dabei wurden ausschließlich proteotypische (unique) Peptide des entsprechenden Proteins quantifiziert. Die normalisierten Proteinabundanzen wurden in Microsoft Excel exportiert,  $\log_2$  transformiert und für die Berechnung der Abundanzverhältnisse sowie für die statistische Auswertung verwendet.

### 3.7.4 Statistische Auswertung der Proteinabundanzen

Zur Auswertung der Abundanzverhältnisse wurde für jedes identifizierte Protein ein Quotient aus dem Mittelwert der Proteinabundanzen der CD4<sup>+</sup>-Proben von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen gebildet (Ratio). Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter Student's *t*-Test mit normalisierten und  $\log_2$  transformierten Proteinabundanzen der CD4<sup>+</sup>-Proben von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen

---

<sup>25</sup> Biognosys, Schlieren, Schweiz

durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgesetzt. Ein Signifikanzwert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant eingestuft.

### 3.7.5 Visualisierung der proteomischen Datenanalyse

#### 3.7.5.1 Heatmap

Zur grafischen Darstellung der Abundanzverhältnisse der identifizierten Proteine (*unique peptides*  $\geq 2$ ) wurden die jeweiligen Proteinabundanzen der analysierten Zellen pro Tier farblich als Abweichungen der Einzelwerte vom Gesamtmedian in einer Heatmap visualisiert (normalisierte, log<sub>2</sub> transformierte Abundanzwerte). Diese wurde mit Java Tree View erstellt. Dabei ist eine höhere Abundanz in gelb und eine geringere Abundanz als der Median aller Zellen in blau dargestellt. Das Ausmaß der Abweichung ist durch die Abweichung der Intensität der Farbe beschrieben. Des Weiteren wurden die erstellten Proteinprofile zur Bestimmung der Ähnlichkeit nach einem Algorithmus hierarchisch geclustert. Vertikal sind dabei die Proben der neun Schweine geclustert (WT: Wildtypen; INS: INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine), horizontal die identifizierten Proteine.

#### 3.7.5.2 Volcano Plot

Im Volcano Plot ist das Verhältnis von statistischer Signifikanz ( $p < 0,05$ ) und der Ratio dargestellt. Die x-Achse zeigt die log<sub>2</sub> transformierten Abundanzverhältnisse aller auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen identifizierten Proteine mit  $\geq 2$  unigen Peptiden. Die y-Achse zeigt die korrespondierenden negativen log<sub>10</sub> transformierten Signifikanzwerte  $p$ . Hierdurch werden Proteine, mit niedrigem  $p$ -Level und hohem differentiellen Faktor hervorgehoben und im oberen Bereich angezeigt. Es sollten bei der Analyse die Proteine betrachtet werden, die einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  entsprachen und mindestens einer 2-fach differentiellen Proteinexpression unterlagen (Grenzwerte durch Linien markiert). Der Volcano Plot wurde in Graph Pad Prism erstellt.

### 3.8 Immunzytochemie

#### 3.8.1 Puffer und Antikörper

##### 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

DAPI<sup>22</sup>, gesättigte Lösung

Folgende primäre und Fluorochrom-konjugierte Antikörper wurden zur immunzytochemischen Markierung verwendet:

Antikörper + Fluorochrom	Klon	Isotyp	Herkunft	Verdünnung
Anti-human Annexin A1	--	Kaninchen IgG	Thermo Fisher Scientific,Ulm	1:100
Anti-Schwein CD4 alpha FITC	MIL17	Maus IgG <sub>2b</sub>	Biorad, Feldkirchen	1:20

Folgender sekundärer Antikörper wurde verwendet:

Antikörper + Fluorochrom	Wirtsspezies	Herkunft	Verdünnung
anti-Kaninchen IgG(H+L) Alexa Fluor® 647	Ziege	Thermo Fisher Scientific,Ulm	1:500

#### 3.8.2 Immunzytochemische Färbung

Die Immunfluoreszenz (IF) nutzt Fluorochrom-konjugierte Antikörper, um durch Fluoreszenz die Lokalisierung und relative Expression von Zielproteinen in fixierten Zellen zu untersuchen. Zur Identifizierung des massenspektrometrisch identifizierten Proteins Annexin A1 wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Fluoreszenzfärbung, wie im Kapitel 3.3.3 beschrieben, gefärbt. Dafür wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen vom Wildtyp und INS<sup>C94Y</sup> tg Schwein im Doppelansatz mit einem anti-Schwein CD4-Antikörper (FITC), zur Kontrolle der Reinheit der CD4-Fraktion, inkubiert und anschließend gewaschen. Anschließend erfolgte in jeweils einer Delle der CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Wildtypen und des INS<sup>C94Y</sup> tg Schweins eine Permeabilisierung der Zellen, um intrazelluläre Epitope zu

detektieren. Die andere Delle wurde nicht permeabilisiert. Nach der Inkubation des anti-human-Annexin A1-Antikörpers und dem sekundären Antikörper anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 647 wurden die Zellen mit 1 % PFA fixiert und anschließend mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (1:100) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Etwa  $5 \times 10^4$  positiv selektierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden auf einen Objektträger<sup>26</sup> aufgetragen und für 10 Minuten bei 300 rcf in einer Zytocentrifuge<sup>27</sup> zentrifugiert. Die Objektträger wurden im Anschluss unverzüglich kräftig abgekippt und die anhaftenden Zellen mit Fluoromount for Microscopy Mediums<sup>28</sup> eingedeckelt. Die Bildaufnahme und Auswertung der immunzytochemischen Markierung erfolgte mit einem Leica Dmi8 Mikroskop<sup>29</sup> und der dazugehörigen LAS-X-Software<sup>30</sup>.

---

<sup>26</sup> Medite, Burgdorf

<sup>27</sup> Eppendorf, Wessling-Berzdorf

<sup>28</sup> Serva, Rosenheim

<sup>29</sup> Leica, Wetzlar

<sup>30</sup> <https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/>

## 4 ERGEBNISSE

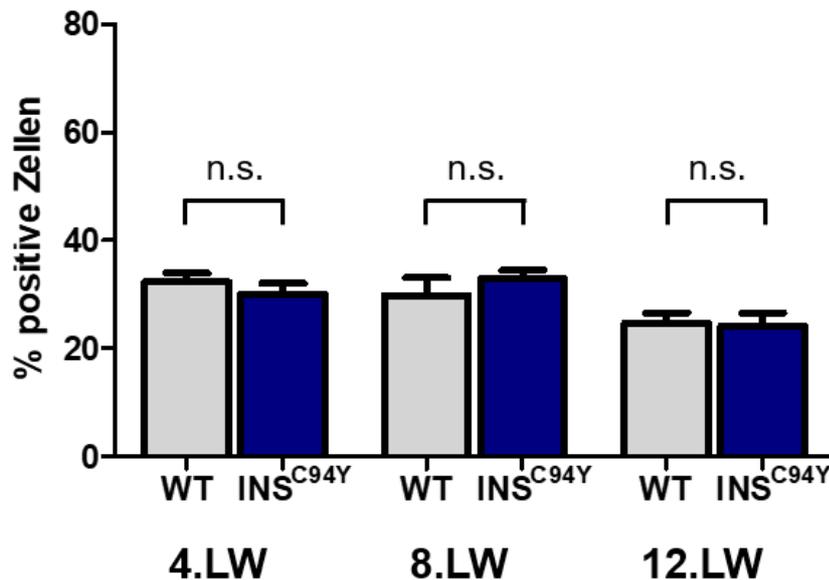
### 4.1 Lymphozytenpopulationen in peripheren mononukleären Blutzellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine

#### 4.1.1 Periphere B- und T-Lymphozyten bei INS<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen

Zu Beginn der Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob sich der prozentuale Anteil von Lymphozyten innerhalb der peripheren mononukleären Blutzellen zwischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen und nicht-transgenen Wildtypen unterscheidet. Es wurden hierfür PBMCs der beiden Gruppen aus der 4., 8. und 12. Lebenswoche mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und vergleichend mit monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenproteine von B- und T-Zellen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Identifizierung von B-Zellen wurde ein kreuzreaktiver anti-human CD79 $\alpha$ -Antikörper verwendet. CD79 $\alpha$ /CD79 $\beta$ -Heterodimere formen assoziiert an Membran-Immunglobulin-Moleküle den humanen B-Zell-Rezeptorkomplex (Hombach et al. 1990). Mangels speziesspezifischer monoklonaler Antikörper gegen porcine B-Zell-Antigene, werden kreuzreaktive Antikörper gegen B-Zellen des Menschen als potentielle Identifizierungsmarker verwendet (Faldyna et al. 2007).

Der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten in PBMCs von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen zeigte im altersabhängigen Vergleich weder in der 4., noch in der 8. oder in der 12. Lebenswoche signifikante Unterschiede zwischen den Phänotypen (Abbildung 4.1). Die Untersuchung ergab in der 4. Lebenswoche einen prozentualen Anteil von 32,3%  $\pm$  3,8% B-Lymphozyten bei den PBMCs der Wildtypen (n=6) im Vergleich zu 30,0%  $\pm$  5,3% (n=8) bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen. Ähnliche Werte konnten in der 8. Lebenswoche gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten 29,9%  $\pm$  5,6% der PBMCs der Wildtypen (n=4) und 32,9%  $\pm$  2,7% der PBMCs der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine (n=4) CD79 $\alpha^+$ . In der 12. Lebenswoche wurde ein prozentualer B-Lymphozyten-Anteil von 24,6%  $\pm$  4,8% bei den Wildtypen (n=7) und von 24,0%  $\pm$  6,0% bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=7) gemessen.

**B-Zellen**

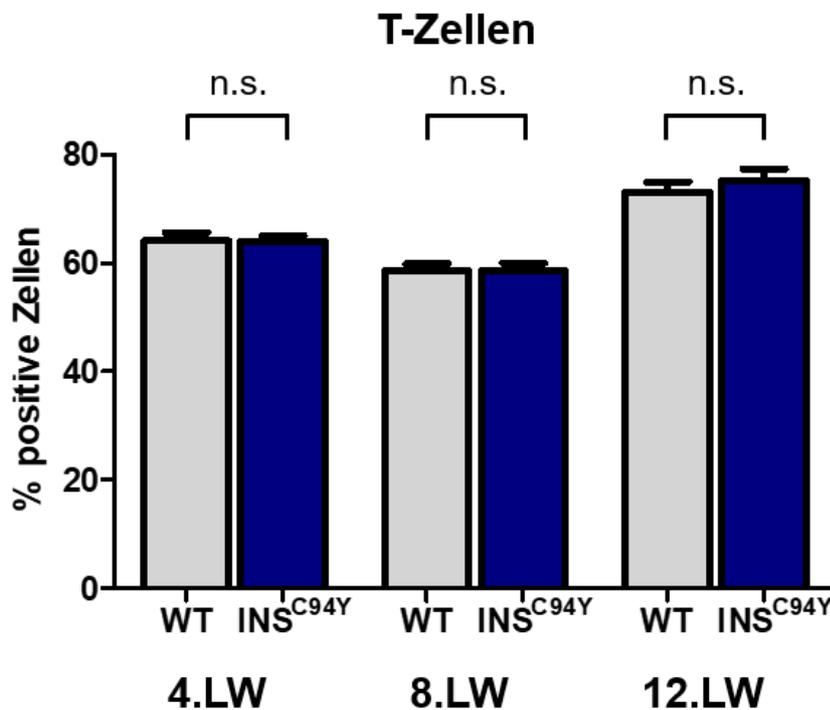
**Abbildung 4.1** Prozentualer Anteil von B-Lymphozyten in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen

Vergleichend dargestellt ist der mittlere Prozentsatz und der Standardfehler (SEM) positiv markierter PBMCs von Wildtypen (graue Säulen, WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Säulen, INS<sup>C94Y</sup>), die zum Zeitpunkt der 4. (WT n=6; INS<sup>C94Y</sup> n=8), 8. (WT n=4; INS<sup>C94Y</sup> n=4) und 12. Lebenswoche (WT n=7; INS<sup>C94Y</sup> n=7) mit einem anti-human CD79 $\alpha$ -Antikörper als B-Zell-Marker markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert wurden. Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im prozentualen B-Zell-Anteil zwischen nicht-transgenen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen festgestellt werden (n.s.).

Die porzinen T-Lymphozyten wurden unter Verwendung eines kreuzreaktiven anti-human CD3 $\epsilon$ -Antikörpers detektiert (Jones et al. 1993). CD3 $\epsilon$  ist essentieller Bestandteil des CD3-Transmembrankomplexes, welcher nicht-kovalent an den T-Zell-Rezeptor gebunden ist und gemeinsam mit diesem den T-Zell-Rezeptorkomplex formt (Mariuzza, Agnihotri, and Orban 2019).

Im Vergleich des prozentualen T-Lymphozyten-Anteils porziner PBMCs konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen zum Zeitpunkt der 4., 8. und 12. Lebenswoche festgestellt werden (Abbildung 4.2). Der Anteil der CD3 $\epsilon$ -positiven PBMCs lag in der 4. Lebenswoche bei den Wildtypen bei 64,2%  $\pm$  4,2% (n=9) und bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen bei 64,0%  $\pm$  2,8% (n=8). In der 8. Lebenswoche konnten 58,6%  $\pm$  4,1% bei den PBMCs aus Wildtypen (n=10) und 58,6%  $\pm$  4,3% bei den PBMCs aus diabetischen Schweinen

(n=10) als T-Zellen ermittelt werden. Im Alter von 12 Lebenswochen erhöhte sich der Anteil der CD3ε-positiven PBMCs auf 73,1% ± 7,8% bei den Wildtypen (n=19) und auf 75,3% ± 8,1% bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=16).



**Abbildung 4.2** Prozentualer Anteil von T-Lymphozyten in porcinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen

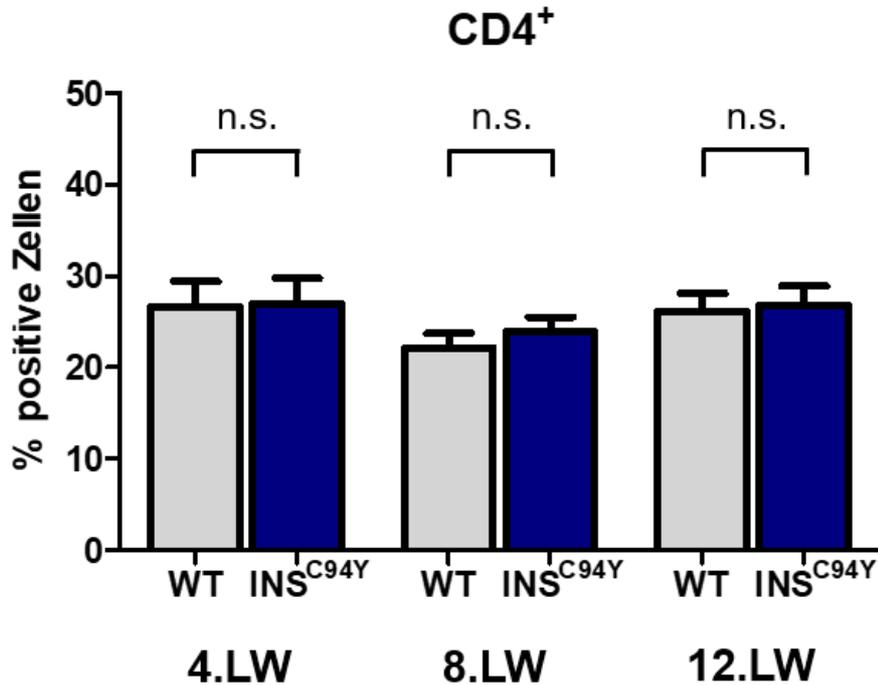
Vergleichend dargestellt ist der mittlere Prozentsatz und der Standardfehler (SEM) positiv markierter PBMCs von Wildtypen (graue Säulen, WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Säulen, INS<sup>C94Y</sup>), die zum Zeitpunkt der 4. (WT n=6; INS<sup>C94Y</sup> n=8), 8. (WT n=4; INS<sup>C94Y</sup> n=4) und 12. Lebenswoche (WT n=7; INS<sup>C94Y</sup> n=7) mit einem anti-human-CD3ε- Antikörper als T-Zell-Marker markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert wurden. Die Unterschiede im prozentualen T-Zell-Anteil waren zwischen nicht-transgenen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen zu keinem Zeitpunkt signifikant (n.s.).

#### 4.1.2 Subpopulationen peripherer T-Lymphozyten bei INS<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen

Die heterogene Gruppe der T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup> Lymphozyten; T-Zellen) sollte im nächsten Schritt durch die Markierung von Differenzierungsantigenen und der anschließenden Bestimmung der prozentualen Anteile einzelner T-Zell-Subpopulationen in der 4., 8. und 12. Lebenswoche genauer charakterisiert werden. Um das Expressionsmuster zu vergleichen, wurden die PBMCs von Wildtypen und

INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen mit Antikörpern gegen die Subpopulationsantigene von  $\alpha\beta$ T-Zellen CD4 und CD8 markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zur Identifizierung von  $\gamma\delta$ T-Zellen wurde ein anti-SWC5-Antikörper verwendet, der im *International Swine Cluster of Differentiation (CD) Workshop* als Antikörper gegen SWC5 als porcines Leukozytendifferenzierungsantigen eindeutig für  $\gamma\delta$ T-Zellen charakterisiert wurde (Lunney et al. 1994).

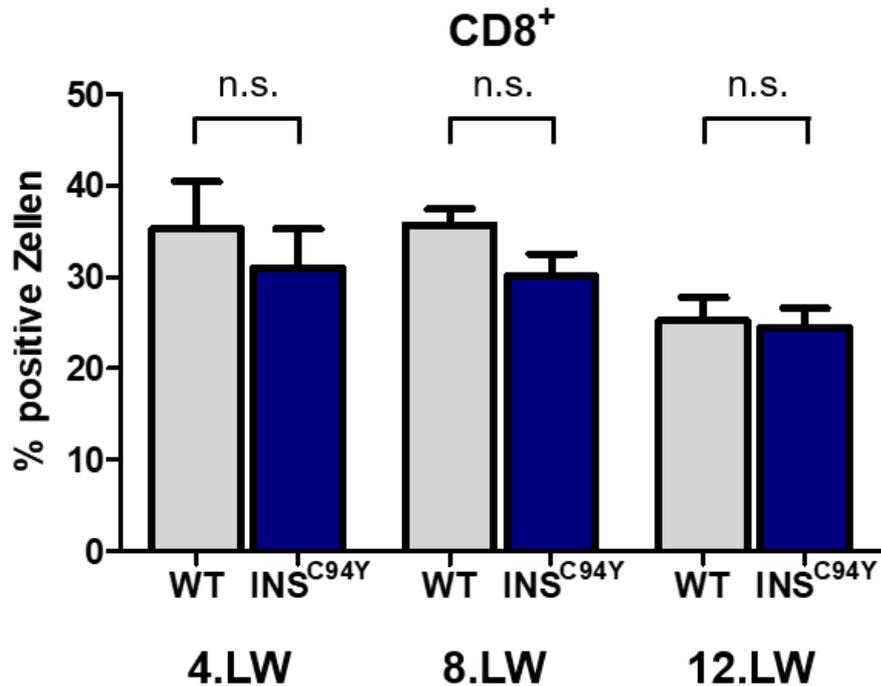
Im Vergleich porziner PBMCs ließen sich im prozentualen Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen nicht-transgenen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 4., 8. und 12. Lebenswoche feststellen (Abbildung 4.3). In der 4. Lebenswoche lag der prozentuale Anteil der CD4-positiven PBMCs bei 26,7%  $\pm$  7,8% bei den Wildtypen (n=9) und bei 27,0%  $\pm$  7,3% bei den diabetischen Schweinen (n=8). Zum Zeitpunkt der 8. Lebenswoche wurde CD4<sup>+</sup> von 22,2%  $\pm$  5,2% der PBMCs aus Wildtypen (n=12) und von 23,9  $\pm$  5,5% der PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=12) exprimiert. Im Alter von 12 Lebenswochen konnte eine positive CD4-Population von 26,2%  $\pm$  8,2% bei den Wildtypen (n=19) und 26,8%  $\pm$  8,3% bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=17) gemessen werden.



**Abbildung 4.3** Prozentualer Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in porcinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen

Das Säulendiagramm zeigt den mittleren Prozentsatz und den Standardfehler (SEM) von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBMCs von Wildtypen (graue Säulen, WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Säulen, INS<sup>C94Y</sup>) jeweils vergleichend in der 4., 8. und 12. Lebenswoche (LW). Der Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen der 4.LW (WT n=9, INS<sup>C94Y</sup> n=8), der 8.LW (WT n=12, INS<sup>C94Y</sup> n=12) und der 12.LW (WT n=19, INS<sup>C94Y</sup> n=17) keine signifikanten Unterschiede (n.s.).

Auch in der CD8α<sup>+</sup> Population konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den PBMCs der Wildtypen und der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine in der 4., 8. und 12. Lebenswoche beobachtet werden (Abbildung 4.4). Der prozentuale Anteil der CD8α-positiven PBMCs machte in der 4. Lebenswoche 35,3% ± 13,7% bei den Wildtypen (n=8) und 31,0% ± 11,2% bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=8) aus. In der 8. Lebenswoche konnte eine Population von 35,7% ± 5,9% bei den PBMCs aus Wildtypen (n=12) und von 30,1% ± 8,1% bei den PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=12) als CD8α<sup>+</sup> identifiziert werden. Im Alter von 12 Lebenswochen exprimierten 27,1% ± 10,9% der Wildtyp-PBMCs (n=20) und 25,6% ± 8,2% der PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=17) CD8α<sup>+</sup>. Es zeigte sich eine vergleichbare prozentuale Verteilung in der 4. und 8. Lebenswoche in beiden Gruppen sowie eine etwas geringere Expression von CD8α<sup>+</sup> auf PBMCs von Wildtypen und von INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 12. Lebenswoche.

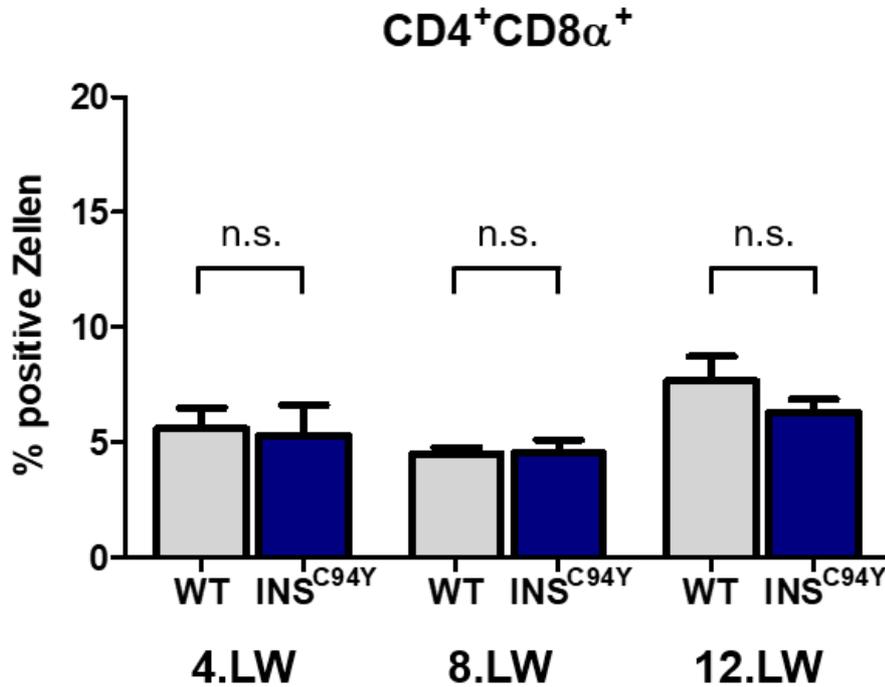


**Abbildung 4.4** Prozentualer Anteil von CD8 $\alpha^+$  Zellen in porcinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen

Das Säulendiagramm zeigt den mittleren Prozentsatz und den Standardfehler (SEM) von CD8 $\alpha^+$  Zellen in PBMCs von Wildtypen (graue Säulen, WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Säulen, INS<sup>C94Y</sup>) jeweils vergleichend in der 4., 8. und 12. Lebenswoche (LW). Der Anteil CD8 $\alpha^+$  Zellen zeigte zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen der 4.LW (WT n=8, INS<sup>C94Y</sup> n=8), der 8.LW (WT n=8, INS<sup>C94Y</sup> n=12) und der 12.LW (WT n=20, INS<sup>C94Y</sup> n=17) keine signifikanten Unterschiede (n.s.).

Durch den bedeutenden Anteil an CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha^+$  T-Zellen beim Schwein (Saalmüller et al. 1987) wurde ergänzend die altersabhängige Entwicklung dieser Population bestimmt. Im Vergleich der Altersgruppen zeigte sich dabei der größte Anteil CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha^+$  T-Zellen in der 12. Lebenswoche. Im Vergleich zwischen Wildtypen und diabetischen Schweinen konnte diese Zunahme bei beiden Phänotypen beobachtet werden. Die Unterschiede der CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha^+$  T-Zellen waren in der 4., 8., und 12. Lebenswoche nicht signifikant (Abbildung 4.5). In der 4. Lebenswoche betrug der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha^+$  T-Zellen bei den PBMCs der Wildtypen 5,6%  $\pm$  2,4% (n=8). Die PBMCs der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine waren zu 5,3  $\pm$  3,5% (n=8) CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha^+$ . Im Alter von 8 Lebenswochen lag der Anteil dieser Population bei den Wildtypen bei 4,5%  $\pm$  0,8% (n=8) und bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen bei 4,5%  $\pm$  1,7% (n=10). In der 12. Lebenswoche hatte sich die CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha^+$  T-Zell-Population auf 7,7%  $\pm$  2,6% bei den Wildtypen (n=7) und auf 6,3%  $\pm$  1,5% bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=8) erhöht. Der geringere prozentuale Anteil in der 4. und 8. Lebenswoche und auch die Zunahme in

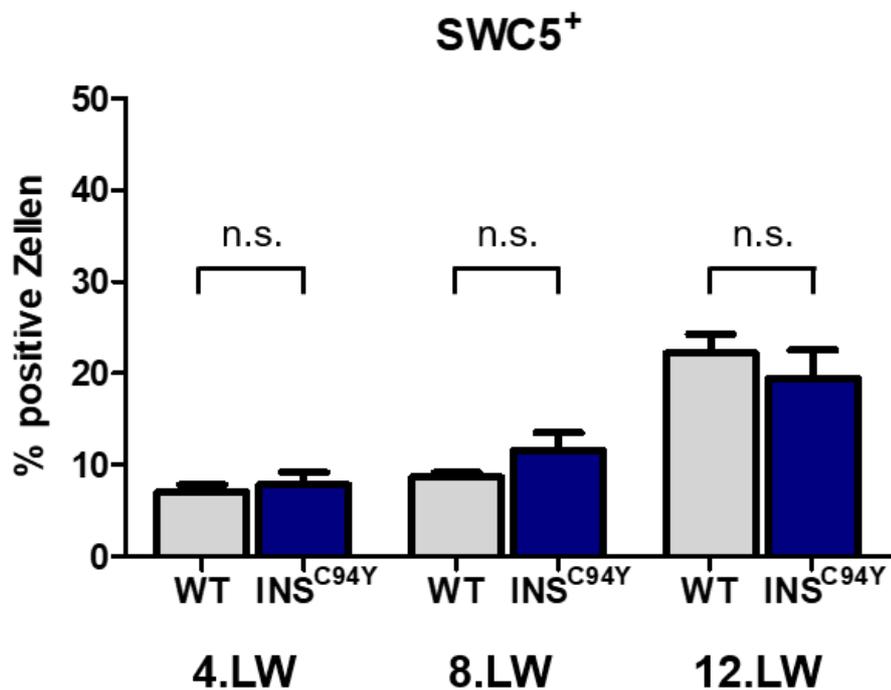
der 12. Lebenswoche konnten in beiden Gruppen gemessen werden, die Unterschiede waren nicht signifikant.



**Abbildung 4.5** Prozentualer Anteil von CD4<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> T-Zellen in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen

Das Säulendiagramm zeigt den mittleren Prozentsatz und den Standardfehler (SEM) von CD4<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> T-Zellen in PBMCs von Wildtypen (graue Säulen, WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Säulen, INS<sup>C94Y</sup>) jeweils vergleichend in der 4., 8. und 12. Lebenswoche (LW). Der Anteil CD4<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> T-Zellen war in beiden Gruppen im Alter von 12 LW am höchsten. Im Vergleich der PBMCs aus Wildtypen und diabetischen Schweinen zeigten sich in der 4.LW (WT n=8, INS<sup>C94Y</sup> n=8), in der 8.LW (WT n=7, INS<sup>C94Y</sup> n=8) und in der 12.LW (WT n=9, INS<sup>C94Y</sup> n=10) keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil von CD4<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup> T-Zellen (n.s.).

Neben den Subpopulationen der  $\alpha\beta$ T-Zellen wurde altersbezogen ebenfalls der prozentuale Anteil der  $\gamma\delta$ T-Zellen in PBMCs von Wildtyp- und diabetischen Schweinen bestimmt. Hier zeigte sich in den porzinen PBMCs eine altersabhängige steigende Expression des Oberflächenproteins SWC5<sup>+</sup> von der 4. bis zur 12. Lebenswoche. Im Vergleich zwischen den Phänotypen der Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine waren keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil SWC5<sup>+</sup> Zellen festzustellen (Abbildung 4.6). Dieser lag in der 4. Lebenswoche bei den Wildtypen bei 7,0% ± 1,4% (n=4) und bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen bei 7,8% ± 2,4% (n=4). Im Alter von 8 Lebenswochen konnten 8,7% ± 0,8% der PBMCs aus Wildtypen (n=4) und 11,6% ± 3,4% der PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=4) als SWC5<sup>+</sup> bestimmt werden. In der 12. Lebenswoche erhöhte sich der Anteil der SWC5-positiven PBMCs auf 22,2% ± 6,2% bei den Wildtypen (n=10) und auf 19,5% ± 9,6% bei PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=11).



**Abbildung 4.6 Prozentualer Anteil von SWC5<sup>+</sup> Zellen in porzinen PBMCs unterschiedlicher Altersgruppen**

Das Säulendiagramm zeigt den mittleren Prozentsatz und den Standardfehler (SEM) von SWC5<sup>+</sup> Zellen in PBMCs von Wildtypen (graue Säulen, WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Säulen, INS<sup>C94Y</sup>) jeweils vergleichend in der 4., 8. und 12. Lebenswoche (LW). Der Anteil positiver SWC5<sup>+</sup> Zellen stieg in den PBMCs beider Gruppen kontinuierlich von der 4. bis zur 12. LW an. Im Vergleich zwischen den PBMCs aus Wildtypen und diabetischen Schweinen zeigten sich in der 4.LW (WT n=4, INS<sup>C94Y</sup> n=4), in der 8.LW (WT n=4, INS<sup>C94Y</sup> n=4) und in der 12.LW (WT n=10, INS<sup>C94Y</sup> n=11) keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil SWC5<sup>+</sup> Zellen (n.s.).

Mittels durchflusszytometrischer Analyse charakteristischer Lymphozyten-differenzierungsantigene wie CD3 $\epsilon$ , CD79 $\alpha$ , CD4, CD8 $\alpha$  und SWC5 konnten keine signifikanten Unterschiede des prozentualen B- und T-Zell-Anteils sowie weiterhin keine signifikanten Unterschiede von T-Zell-Subpopulationen in PBMCs von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 4., 8. und 12. Lebenswoche festgestellt werden. Der nächste Schritt war nun die metabolische Phänotypisierung der PBMCs, um mögliche Unterschiede im metabolischen Phänotyp der PBMCs zu detektieren (Kramer et al. 2014).

### **4.2 Untersuchungen zum zellulären Metabolismus von peripheren Blutzellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine**

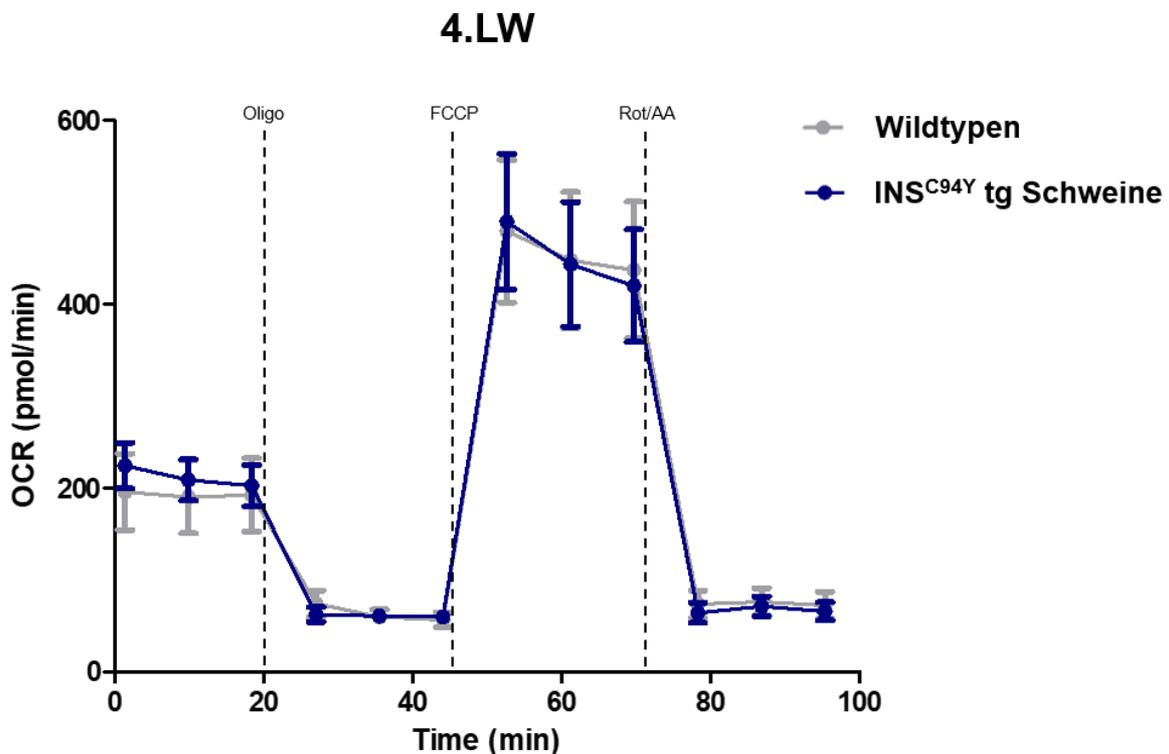
Durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung wird Glukose effizient in den Zellen verstoffwechselt, um ATP zu generieren (Shin et al. 2020). Unter Verwendung des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests wurde das metabolische Potential von porzinen Wildtyp-PBMCs und diabetischen PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen untersucht, um mögliche, funktionell relevante Unterschiede bei der mitochondrialen Respiration sowie der glykolytischen Aktivität der PBMCs unter Basalbedingungen und nach Modulation der Atmungskette bestimmen zu können.

#### **4.2.1 Mitochondriale Respiration**

Für eine gesteigerte Energiegewinnung kann Pyruvat im Mitochondrium unter Sauerstoffverbrauch zu den energiearmen Produkten Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Wasser (H<sub>2</sub>O) abgebaut werden, wobei die dabei freiwerdende Energie die Synthese von ATP durch oxidative Phosphorylierung antreibt (O'Neill, Kishton, and Rathmell 2016). Der Sauerstoffverbrauch von Zellen kann durch Manipulation der mitochondrialen Komplexe moduliert werden. Aus diesem Grund sollte mittels Seahorse XF Cell Mito Stress Test untersucht werden, inwiefern sich die Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) von porzinen PBMCs als Indikator der mitochondrialen Funktion bei Manipulation ändert und ob dabei Unterschiede im metabolischen Potential zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen festgestellt werden können.

## Ergebnisse

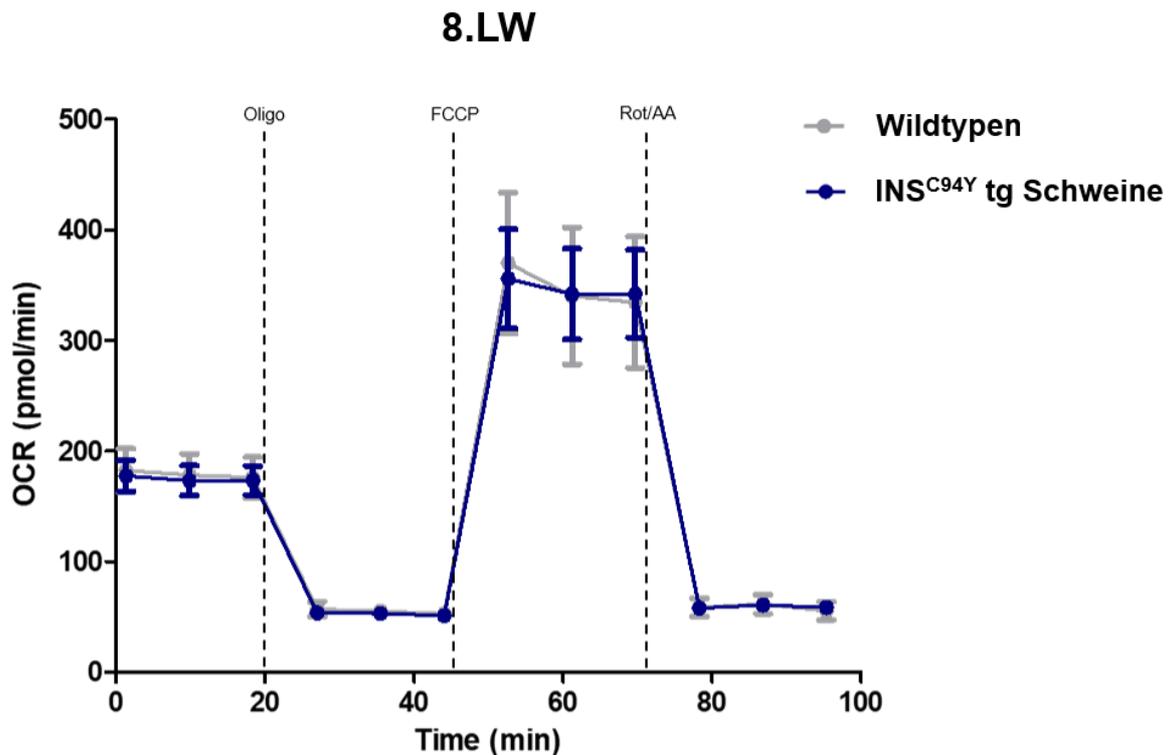
In Abbildung 4.7 ist die mittlere Sauerstoffverbrauchsrate von porzinen PBMC aus Wildtypen (n=4) und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen (n=6) in der 4. Lebenswoche dargestellt. Im ersten Messzyklus wurde die basale Respiration der Zellen bestimmt. Der basale Sauerstoffverbrauch der PBMCs unterschied sich zwischen Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in diesem Alter nicht. Darüber hinaus zeigten sich auch nach Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin, nach Entkopplung der Atmungskette mit FCCP und Inhibition zweier Atmungskettenkomplexe mit Rotenon und Antimycin A keine signifikanten Unterschiede bei der mitochondrialen Respiration zwischen den PBMCs aus Wildtypen und aus  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen.



**Abbildung 4.7 Mitochondriale Respiration gemessen als Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) von PBMCs aus Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in der 4.LW**

Die Abbildung zeigt den mittleren Sauerstoffverbrauch der Zellen (+ Standardfehler; SEM) in Abhängigkeit der Zeit von porzinen Wildtyp-PBMCs (graue Kurven; n=4) und PBMCs aus diabetischen  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen (blaue Kurven; n=6) in der 4.LW. Es waren in dieser Altersgruppe keine signifikanten Unterschiede in der mitochondrialen Respiration zwischen den Gruppen festzustellen (n.s.).

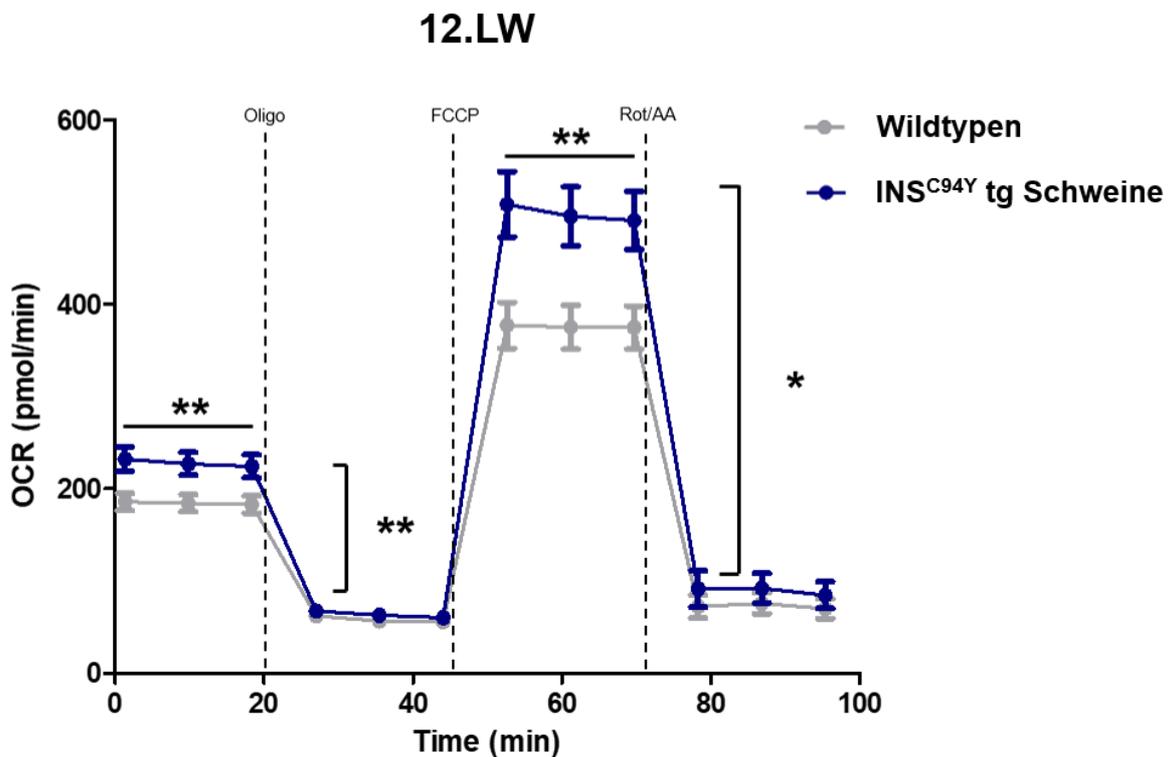
Auch in der 8. Lebenswoche waren keine Unterschiede in der basalen Respiration der PBMCs von Wildtypen (n=10) und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen (n=12) messbar (Abbildung 4.8). Es konnte weiterhin nach Injektion von Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A in beiden Gruppen ein nahezu identischer Sauerstoffverbrauch der PBMCs festgestellt werden. Demnach gab es in der 8. Lebenswoche der porzinen PBMCs keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der basalen Respiration, der Reservekapazität oder der maximalen Respiration zwischen den Wildtyp-PBMCs und den diabetischen PBMCs.



**Abbildung 4.8 Mitochondriale Respiration gemessen als Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) von PBMCs aus Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in der 8.LW**

Die Abbildung zeigt den mittleren Sauerstoffverbrauch der Zellen (+ Standardfehler, SEM) in Abhängigkeit der Zeit von porzinen Wildtyp-PBMCs (graue Kurven; n=12) und PBMCs aus diabetischen  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen (blaue Kurven; n=10) in der 8.LW. Es waren in dieser Altersgruppe keine signifikanten Unterschiede in der mitochondrialen Respiration zwischen den Gruppen festzustellen (n.s.).

In der 12. Lebenswoche zeigten sich bereits bei der basalen Respiration im Vergleich der PBMCs eindeutige signifikante Unterschiede im Sauerstoffverbrauch (Abbildung 4.9). Die basale Respiration der diabetischen PBMCs ( $n=10$ ) lag mit  $228,0 \pm 38,0$  pmol  $O_2$ /min signifikant höher als die der Wildtyp-PBMCs ( $n=15$ ) mit  $187,9 \pm 35,1$  pmol  $O_2$ /min (\*\* $p \leq 0,01$ ). Auch die ATP-gekoppelte Respiration war zwischen PBMCs von Wildtyp-Schweinen ( $129,4 \pm 28,7$  pmol  $O_2$ /min) und diabetischen Tieren ( $164,5 \pm 30,8$  pmol  $O_2$ /min) in der 12. Lebenswoche signifikant unterschiedlich (\*\* $p \leq 0,01$ ). Nach FCCP-Injektion und Entkopplung der Atmungskette verbrauchten die PBMCs der  $INS^{C94Y}$  tg Schweine mit  $498,6 \pm 98,5$  pmol  $O_2$ /min deutlich mehr Sauerstoff als die Wildtyp-PBMCs mit  $385,3 \pm 89,1$  pmol  $O_2$ /min. Die Unterschiede der maximalen Respiration (MR) und der Reservekapazität (RK) waren zwischen PBMCs aus Wildtyp-Schweinen und diabetischen  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen signifikant (MR \*\* $p < 0,01$  und RK \* $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4.9 Mitochondriale Respiration gemessen als Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) von PBMCs aus Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in der 12.LW**

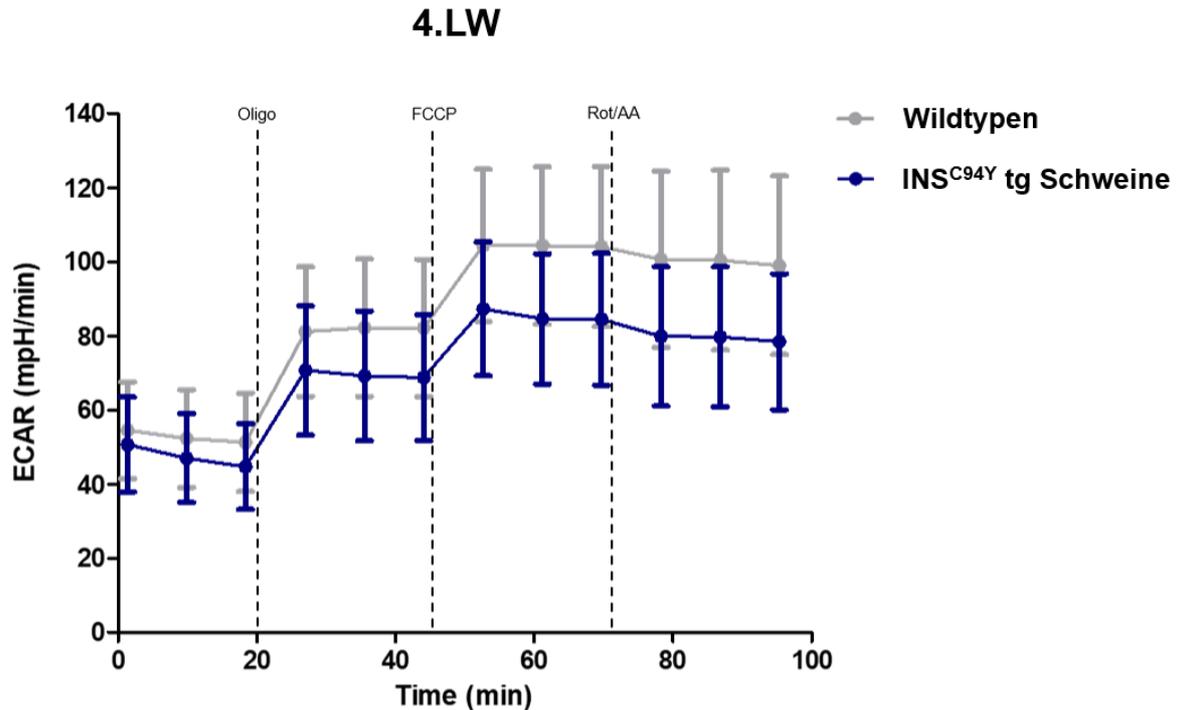
Die Abbildung zeigt den mittleren Sauerstoffverbrauch der Zellen (+ Standardfehler, SEM) in Abhängigkeit der Zeit von porzinen Wildtyp-PBMCs (graue Kurven;  $n=15$ ) und PBMCs aus diabetischen  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen (blaue Kurven;  $n=10$ ) in der 12. LW. Es waren signifikante Unterschiede in der mitochondrialen Respiration zwischen PBMCs von Wildtypen und diabetischen  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen in der basalen Respiration (\*\* $p \leq 0,01$ ; Student's  $t$ -Test), in der ATP-gekoppelten Respiration (\*\* $p \leq 0,01$ ; Student's  $t$ -Test) und nach Zugabe von FCCP in der maximalen Respiration (\*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney-U-Test) sowie in der Reservekapazität (\* $p < 0,05$ ; Student's  $t$ -Test) festzustellen.

Durch Messung des Sauerstoffverbrauchs von PBMCs unter Basalbedingungen und nach Modulation mit Testsubstanzen, die die mitochondriale Respiration beeinflussen, konnten signifikante Unterschiede der mitochondrialen Funktion von porzinen PBMCs von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 12. Lebenswoche festgestellt werden. Die Unterschiede betrafen sowohl die basale mitochondriale Respiration und die ATP-gekoppelte Respiration als auch die Reservekapazität und die maximale Respiration der PBMCs. Da neben der oxidativen Phosphorylierung den Zellen mit der Glykolyse ein weiterer Stoffwechselweg zur schnellen Energiebereitstellung zur Verfügung steht, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen der Atmungskettenmodulation auf die glykolytische Aktivität der Zellen bestimmt.

### 4.2.2 Glykolytische Aktivität

Durch Inhibition der mitochondrialen Komplexe sind die Zellen gezwungen über alternative Stoffwechselwege ATP zu generieren. Gleichzeitig zum Sauerstoffverbrauch wurde deshalb im Seahorse XF Cell Mito Stress Test durch Messung der Azidifizierungsrate im Medium (Extracellular Acidification Rate, ECAR) die glykolytische Aktivität der PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 4., 8. und 12. Lebenswoche zum einen unter Basalbedingungen und zum anderen als Reaktion auf die mitochondriale Inhibition untersucht.

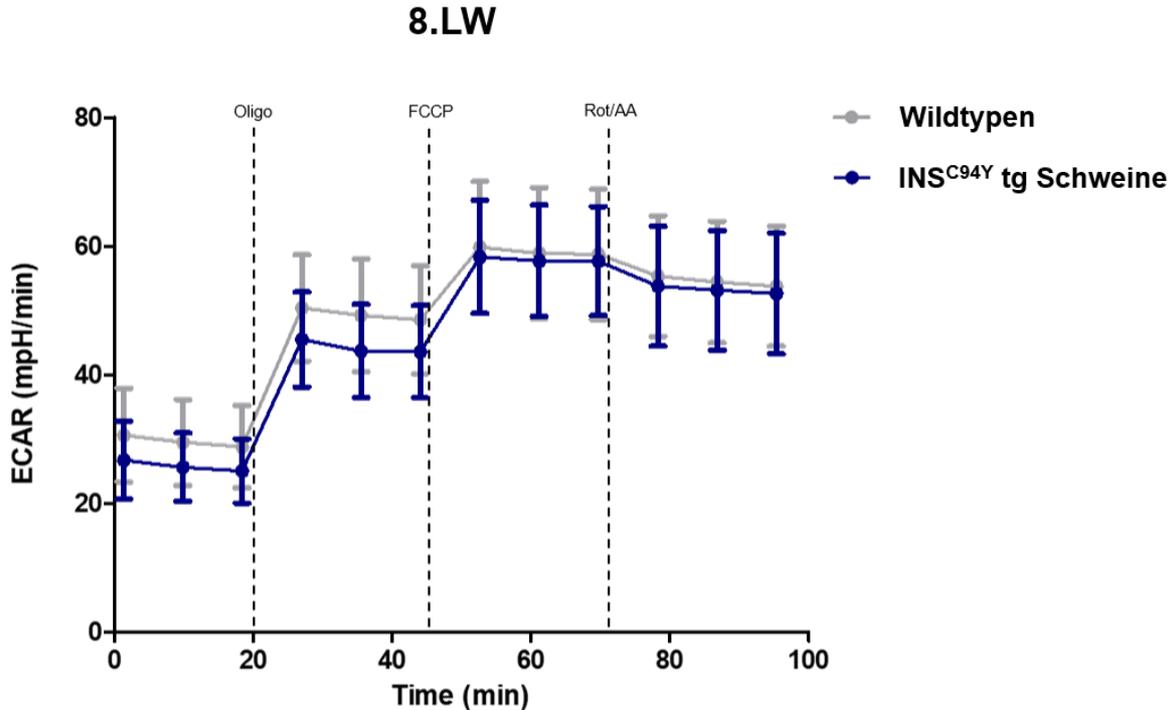
In der 4. Lebenswoche unterschied sich die Azidifizierung des Mediums durch PBMCs von Wildtypen (n=5) nicht von der Azidifizierung, die im Medium der diabetischen PBMCs (n=6) gemessen werden konnte (Abbildung 4.10). Die basale glykolytische Aktivität sowie die Änderung der Azidifizierungsrate nach Modulation der Atmungskette wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp-PBMCs und den PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen auf. Eine hohe metabolische Variabilität der jungen Zellen beider Gruppen ist durch einen hohen Standardfehler angezeigt.



**Abbildung 4.10 Glykolytische Aktivität gemessen als Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) von PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 4.LW**

Die Abbildung zeigt die mittlere Azidifizierungsrate des Mediums (+ Standardfehler, SEM) in Abhängigkeit der Zeit von porzinen Wildtyp-PBMCs (graue Kurve; n=5) und PBMCs aus diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Kurven; n=6) in der 4.LW. Es waren in dieser Altersgruppe keine signifikanten Unterschiede in der glykolytischen Aktivität zwischen den Gruppen festzustellen (n.s.).

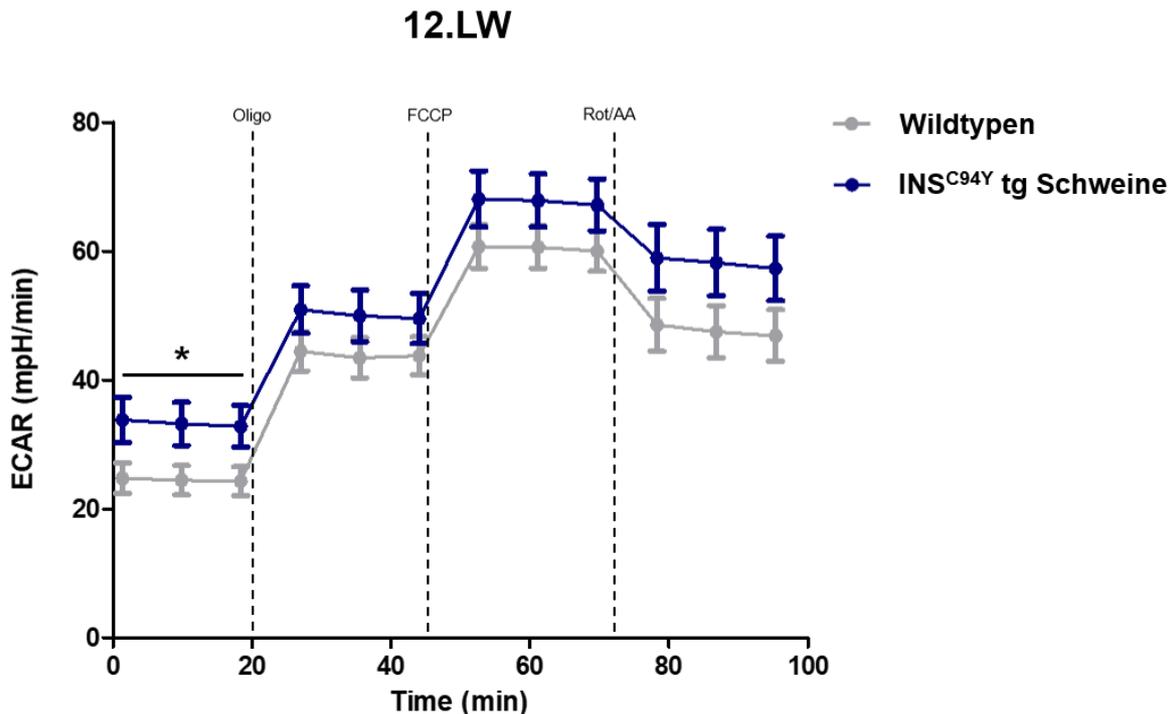
In der 8. Lebenswoche zeigte sich ein nahezu identischer Kurvenverlauf der ECAR von Wildtyp-PBMCs (n=10) und PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=12) (Abbildung 4.11). Sowohl in der basalen glykolytischen Aktivität im ersten Messzyklus, als auch im Anstieg der Ansäuerung durch die Inhibition der mitochondrialen Respiration mittels Oligomycin und daraus resultierender Stoffwechselumstellung der Energiegewinnung hin zur Glykolyse, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und diabetischen PBMCs festgestellt werden. Weiterhin waren durch die Entkopplung der Atmungskette mit FCCP und erneuter Inhibition durch Rotenon und Antimycin A die Azidifizierungsraten in beiden Gruppen gleich.



**Abbildung 4.11 Glykolytische Aktivität gemessen als Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) von PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 8.LW**

Die Abbildung zeigt die mittlere Azidifizierungsrate des Mediums (+ Standardfehler, SEM) in Abhängigkeit der Zeit von porzinen Wildtyp-PBMCs (graue Kurve; n=10) und PBMCs aus diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Kurven; n=12) in der 8.LW. Es waren in dieser Altersgruppe keine signifikanten Unterschiede in der glykolytischen Aktivität zwischen den Gruppen festzustellen (n.s.).

Signifikante Unterschiede zeigten sich auch hier bei der Messung der Azidifizierungsrate in der 12. Lebenswoche (Abbildung 4.12). Die diabetischen PBMCs (n=10) wiesen eine höhere basale glykolytische Aktivität mit einer ECAR von  $33,3 \pm 10,1$  mpH/min im Gegensatz zu der ECAR der Wildtyp-PBMC (n=16) mit  $24,5 \pm 8,6$  mpH/min auf. Diese Abweichung war signifikant (\*p < 0,05) und ließ auf eine höhere glykolytische Aktivität der diabetischen Zellen unter Basalbedingungen schließen. Weiterhin zeigten sich allerdings nach Zugabe von Oligomycin, FCCP und Rotenon und Antimycin A keine signifikanten Unterschiede in der Azidifizierungsrate zwischen PBMCs von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen.



**Abbildung 4.12 Glykolytische Aktivität gemessen als Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) von PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen in der 12.LW**

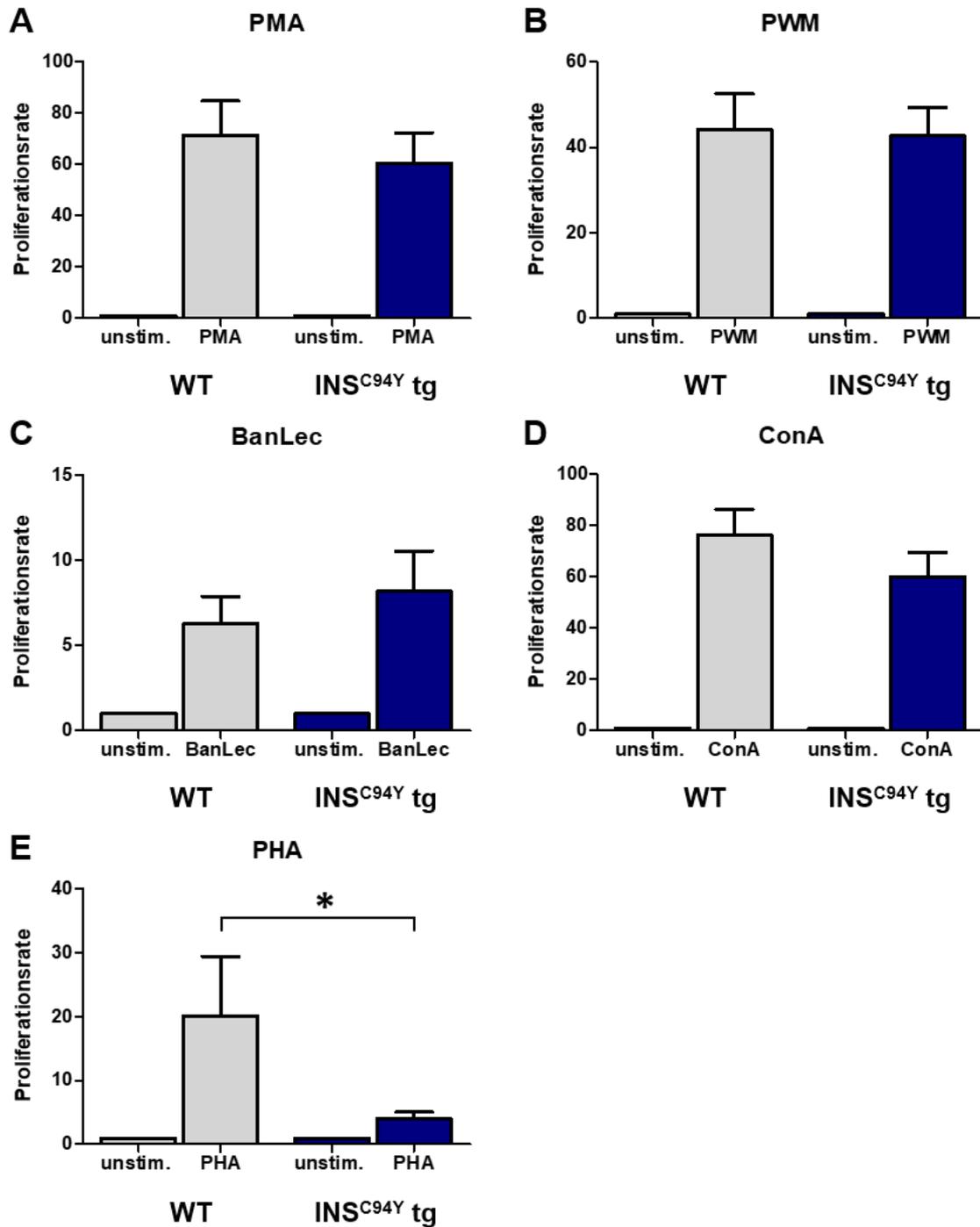
Die Abbildung zeigt die mittlere Azidifizierungsrate des Mediums (+ Standardfehler, SEM) in Abhängigkeit der Zeit von porzinen Wildtyp-PBMCs (graue Kurven; n=15) und PBMCs aus diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Kurven; n=10) in der 12. LW. In dieser Altersgruppe war eine signifikant erhöhte basale glykolytische Aktivität der PBMCs von INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen gegenüber den Wildtyp-PBMCs festzustellen (\*p < 0,05, Student's t-Test).

Zusammenfassend ergaben sich nach Bestimmung der mitochondrialen und glykolytischen Funktion signifikante Unterschiede hinsichtlich des metabolischen Potentials von PBMCs aus diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen im Vergleich zu PBMCs der nicht-transgenen Wildtypen. Die Immunzellen aus einem hyperglykämischen Milieu zeigten demnach unter Basalbedingungen und nach Modulation mit Stressoren eine höhere Respiration sowie eine höhere basale Azidifizierungsrate als Immunzellen aus einem normoglykämischen Milieu. Dies weist auf ein abweichendes metabolisches Verhalten oder eine eventuelle Anpassung der diabetischen PBMCs an das hyperglykämische Milieu hin. Da die Unterschiede erst im Alter von 12 Lebenswochen festzustellen waren, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob die mögliche metabolische Adaptation des Glukosestoffwechsels auch Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten von diabetischen Lymphozyten in dieser Altersgruppe hat.

### 4.3 Polyklonale Stimulation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine

Um mögliche Unterschiede bei der Zellproliferation von PBMCs nach Stimulation *in vitro* zu detektieren, wurden Lymphozyten von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen mit verschiedenen Mitogenen für 48 Stunden stimuliert. Anschließend konnte die Proliferationsrate durch den Einbau des radioaktiven Nukleotids <sup>3</sup>H-Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA mithilfe eines Beta Counters gemessen werden. Pflanzliche Lektine besitzen durch ihre Bindung an Membran-Glykoproteine immunstimulierende Eigenschaften und können somit als Mitogene für Untersuchungen zum Proliferationsverhalten verschiedener Zellen genutzt werden (Bekeredjian-Ding et al. 2012). Eingesetzt wurden die Lektine Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA), Pokeweed Mitogen (PWM), *Musa paradisiaca* (banana) Lektin (BanLec), Concanavalin A (ConA) sowie Phytohämagglutinin (PHA). In Jurkat-Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass PMA die Proteinkinase C und den Calcium-Einstrom stimuliert und somit durch Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktion eine erhöhte Interleukin-2 Expression initiiert und die Proliferation der Lymphozyten angeregt wird (Zhu et al. 2010). Das mitogene Potential von PWM wurde bei murinen und humanen peripheren B-Zellen als eine, dem B-Zell-Rezeptor-Signal vergleichbare, Sensibilisierung von B-Zellen für Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) beschrieben, mit primärer Bedeutung als B-Zell-Stimulanz (Bekeredjian-Ding et al. 2012). Andere Untersuchungen wiesen PWM als ein Mitogen mit stimulierender Wirkung auf B- und T-Zellen aus (Nam et al. 2019). ConA als Mannose- und Glukose-bindendes Lektin besitzt hohes mitogenes Potential und induzierte in murinen T-Zellen vor allem über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 eine T-Zell-Aktivierung (Ando et al. 2014). BanLec wurde von unserer und anderen Arbeitsgruppen als Lektin mit starker mitogener Wirkung auf murine (Peumans et al. 2000) und bovine T-Zellen beschrieben (Lutterberg et al. 2018). PHA wurde ebenfalls als starkes T-Zell-Stimulanz beschrieben, welches durch die Bindung und Quervernetzung des T-Zellrezeptors und des CD3-Komplexes sowie weiterer Oberflächenmoleküle bei humanen T-Zellen einen Calcium-Einstrom in die Zelle und eine Aktivierung und anschließende Proliferation der Zellen induziert (Lin et al. 2016).

Die Proliferationsraten der Lymphozyten nach Stimulation mit den verschiedenen Mitogenen sind in Abbildung 4.13 gezeigt. Die Ergebnisse der 48-stündigen Stimulation mit PMA, PWM, ConA und BanLec ergaben keine signifikanten Unterschiede beim Proliferationsverhalten von Wildtyp-Lymphozyten (n=6) und Lymphozyten aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=6). Im Vergleich zu den unstimulierten Lymphozyten (Proliferationsfaktor=1) erhöhten die Wildtyp-Lymphozyten nach PMA-Stimulation ihre Proliferationsrate auf das 72-fache, die diabetischen Lymphozyten auf das 61-fache (Abbildung 4.13 A). PWM steigerte die Proliferationsrate der Lymphozyten aus Wildtypen auf das 44-fache und bei diabetischen Tieren auf das 43-fache (Abbildung 4.13 B). Auf die BanLec-Stimulation reagierten die Wildtyp-Lymphozyten mit einer 6-fachen Steigerung der Proliferationsrate, wohingegen die Lymphozyten aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen um das 8-fache verstärkt proliferierten (Abbildung 4.13 C). Durch Stimulation mit ConA steigerten die Lymphozyten aus Wildtypen ihre Proliferationsrate um das 76-fache im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, die Lymphozyten aus diabetischen Tieren reagierten mit einer 60-fach verstärkten Proliferation (Abbildung 4.13 D). Interessanterweise erhöhten die Lymphozyten der Wildtypen nach Stimulation mit dem T-Zell-Mitogen PHA ihre Proliferationsrate um das 20-fache, wohingegen die Lymphozyten der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine nur mit einer 4-fach gesteigerten Proliferationsrate reagierten. Die Lymphozyten aus Wildtypen proliferierten damit 5-fach stärker als die Lymphozyten der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine. Die diabetischen Zellen zeigten hierbei eine signifikant reduzierte Proliferation (\*p < 0,05; Abbildung 4.13 E).



**Abbildung 4.13 Polyklonale Stimulation von porcinen Lymphozyten aus dem peripheren Blut**

Lymphozyten von Wildtypen (graue Balken, n=6) und diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Balken, n=6) wurden mit PMA, PWM, BanLec, ConA und PHA (je 1 µg/ml) für 48h stimuliert und es wurde der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau in die DNA im Beta Counter als counts per minute (cpm) gemessen. Dargestellt ist jeweils die Proliferationsrate unstimulierter und stimulierter Lymphozyten, wobei die Proliferationsrate der unstimulierten Zellen dem Faktor 1 entspricht. Die Proliferationsrate der stimulierten Zellen errechnet sich als Quotient aus den cpm der Messung stimulierter Zellen bezogen auf die cpm unstimulierter Zellen. Alle getesteten Mitogene führten zu einer gesteigerten Proliferation der Lymphozyten. Während PMA (A), PWM (B), BanLec (C) und ConA (D) zu keinen signifikanten Unterschieden in der Proliferationsrate von Lymphozyten aus Wildtypen und diabetischen Schweinen

fürten, proliferierten periphere Wildtyp-Lymphozyten 5-mal stärker nach PHA-Stimulation als die peripheren Lymphozyten aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (\*p < 0,05; Student's *t*-Test).

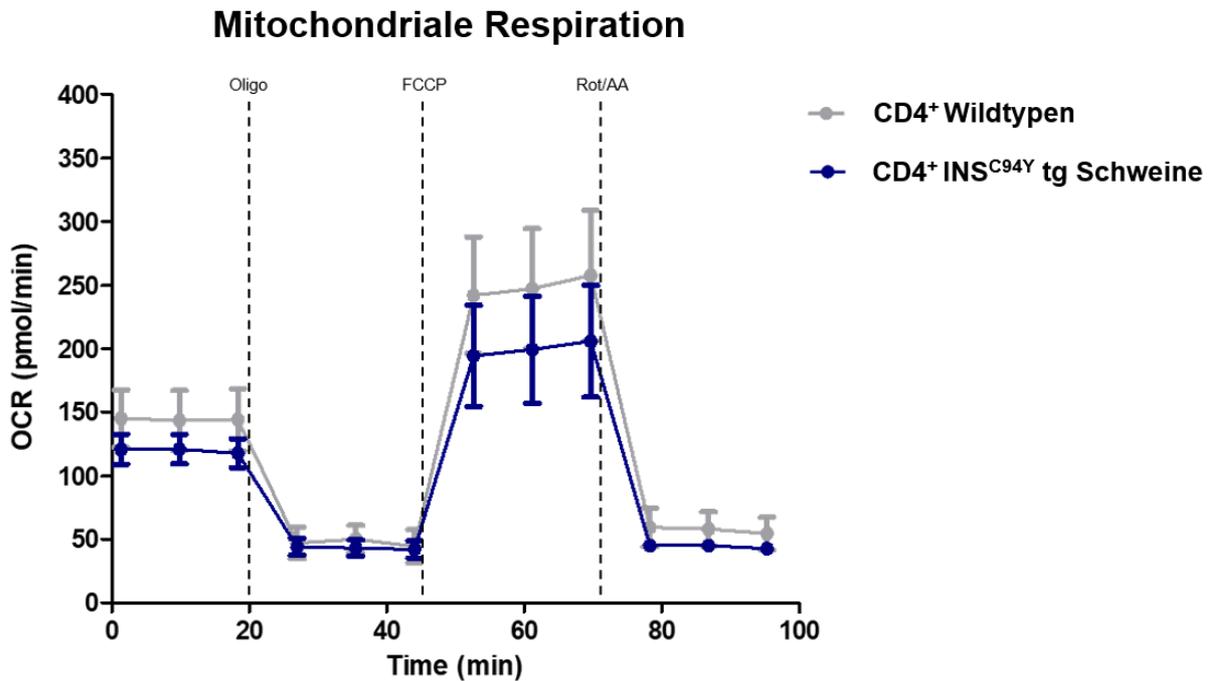
Die Ergebnisse der polyklonalen Stimulation zeigten interessanterweise mit dem selektiven T-Zell-Mitogen PHA ein signifikant verändertes Proliferationsverhalten der diabetischen Lymphozyten. Da die funktionellen Untersuchungen Hinweise darauf gaben, dass die T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine von den Wildtyp-T-Zellen abweichen, sollten im Folgenden periphere CD4<sup>+</sup> T-Zellen genauer phänotypisiert werden.

#### **4.4 Untersuchungen zum zellulären Metabolismus von peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine**

Die vergleichende Untersuchung der mitochondrialen Respiration und glykolytischen Aktivität von PBMCs aus 12 Wochen alten Wildtypen und diabetischen Schweinen ergab signifikante Unterschiede hinsichtlich des metabolischen Potentials von Immunzellen aus einem hyperglykämischen Milieu im Vergleich zu Immunzellen aus einer normoglykämischen Umgebung. Deshalb sollte zunächst die metabolische Funktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in diesem Alter phänotypisiert werden. Aus PBMCs INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine und nicht-transgener Wildtypen wurden dafür CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels magnetischer Separation positiv selektiert (siehe Kapitel 3.6.2).

In Abbildung 4.14 sind die mittleren Sauerstoffverbrauchsraten (OCR) der selektierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Wildtypen (n=4) und der transgenen Tiere (n=4), die unter Verwendung eines Seahorse XF Mito Stress Tests ermittelt wurden, vergleichend dargestellt. Die basale Respiration lag in beiden Gruppen mit einer OCR von 143,8 ± 40,1 pmol O<sub>2</sub>/min bei den Wildtyp- CD4<sup>+</sup> T-Zellen (n=4) und 115,2 ± 26,3 pmol O<sub>2</sub>/min bei den diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (n=4) unter der OCR der PBMCs (Vgl. 4.2.1). Darüber hinaus zeigten sich auch nach Injektion des Inhibitors Oligomycin (Vgl. WT: 47,3 ± 20,9 pmol O<sub>2</sub>/min vs. INS<sup>C94Y</sup> tg: 43,1 ± 13,7 pmol O<sub>2</sub>/min) oder des Entkopplers FCCP (Vgl. WT: 232,2 ± 68,7 pmol O<sub>2</sub>/min vs. INS<sup>C94Y</sup> tg: 170,3 ± 29,6 pmol O<sub>2</sub>/min) sowie nach erneuter Hemmung der Atmungskette durch Rotenon und Antimycin A (Vgl. WT: 57,4 ± 23,7 pmol O<sub>2</sub>/min vs. INS<sup>C94Y</sup> tg: 43,5 ± 8,1 pmol O<sub>2</sub>/min) keine signifikanten Unterschiede in der ATP-gekoppelten Respiration, der maximalen

Respiration oder der Reservekapazität der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich beider Gruppen.

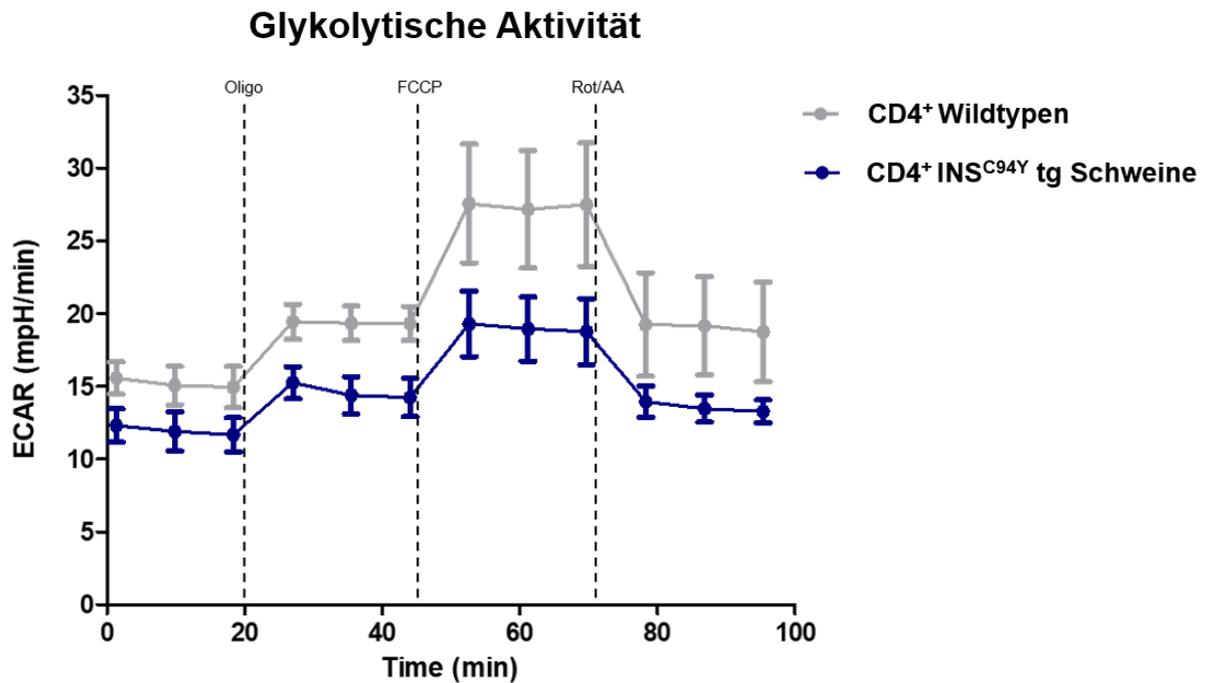


**Abbildung 4.14 Mitochondriale Respiration porziner CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Mittels Seahorse XF Mito Stress Test wurde die mitochondriale Respiration peripherer porziner CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen (graue Kurven; n=4) und diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Kurven, n=4) in der 12. Lebenswoche bestimmt. Das Ergebnis zeigt die mittlere Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (+ Standardfehler, SEM) unter Basalbedingungen und nach Injektion von Oligo und Rot/AA (Inhibition der Atmungskette) und FCCP (Entkopplung der Atmungskette) in Abhängigkeit der Zeit. Die Ergebnisse der gemessenen OCR von porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen wiesen in der mitochondrialen Respiration keine signifikanten Unterschiede auf (n.s.).

Ergänzend zur mitochondrialen Aktivität stellt Abbildung 4.15 die im Seahorse XF Mito Stress Test gemessenen Azidifizierungsraten (ECAR) der Medien dar, mittels welcher jeweils die glykolytische Aktivität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen (n=4) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=4) bestimmt werden konnte. Die basalen Azidifizierungsraten der CD4<sup>+</sup> T-Zellen lagen jeweils mit  $15,2 \pm 2,2$  mpH/min bei den Wildtyp- Zellen und  $12,0 \pm 2,1$  mpH/min bei den diabetischen Zellen niedriger als die zuvor gemessenen basalen Azidifizierungsraten der PBMCs. Die Ergebnisse der basalen glykolytischen Aktivität der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede in den Azidifizierungsraten der Medien nach Injektion von Oligomycin, FCCP oder

Rotenon und Antimycin A zwischen Wildtyp-CD4<sup>+</sup> T-Zellen und diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden.



**Abbildung 4.15 Glykolytische Aktivität porziner CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Mittels Seahorse XF Mito Stress Test wurde die glykolytische Aktivität peripherer porziner CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen (graue Kurven; n=4) und diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (blaue Kurven, n=4) in der 12. Lebenswoche bestimmt. Das Ergebnis zeigt die mittlere Azidifizierungsrate (ECAR) des Mediums (+ Standardfehler, SEM) unter Basalbedingungen und nach Injektion von Oligo und Rot/AA (Inhibition der Atmungskette) und FCCP (Entkopplung der Atmungskette) in Abhängigkeit der Zeit. Die Ergebnisse der gemessenen ECAR von porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen wiesen in der glykolytischen Aktivität keine signifikanten Unterschiede auf (n.s.).

Beim Vergleich des metabolischen Potentials peripherer CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen konnten keine signifikanten Unterschiede bei der mitochondrialen Respiration oder der glykolytischen Aktivität festgestellt werden. Eine Analyse der Zellen auf molekularer Ebene mittels Massenspektrometrie bot die Möglichkeit einer vergleichenden Phänotypisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proteome von Wildtypen und diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen.

## **4.5 Proteomische Analyse von peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen INS<sup>C94Y</sup> transgener Schweine mittels DIA LC-MS/MS**

### **4.5.1 Proteinprofile porziner peripherer CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

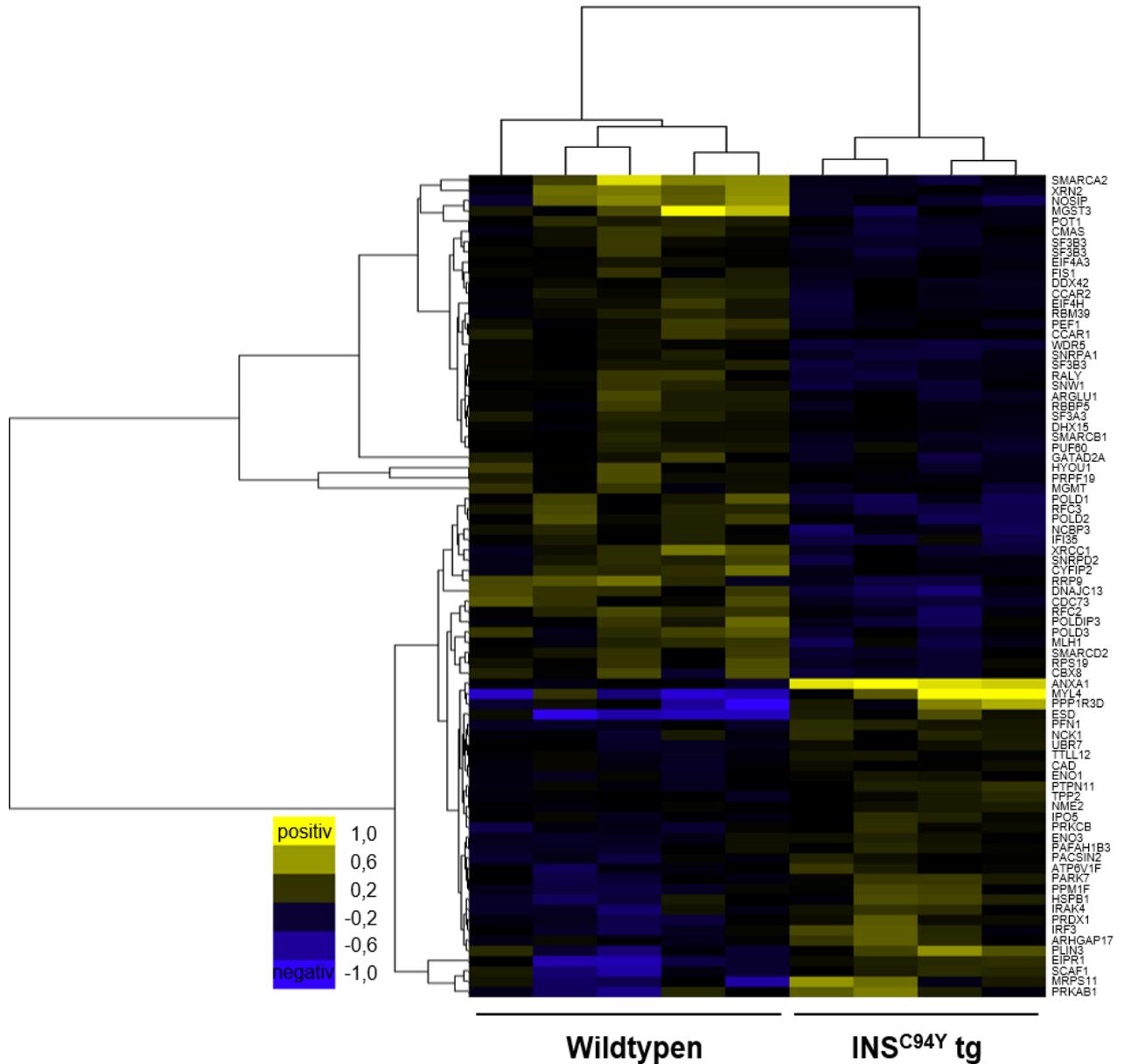
Um mögliche Unterschiede im Proteom diabetischer Immunzellen im Vergleich zu porzinen Wildtyp-Zellen bestimmen zu können, wurden im nächsten Schritt Proteinprofile von peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen erstellt. Mithilfe magnetischer Separation wurden dafür aus PBMCs von fünf Wildtypen und vier diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen im Alter von 12 Lebenswochen CD4<sup>+</sup> T-Zellen positiv selektiert und unter Verwendung der Liquid-Chromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) mittels datenunabhängiger Akquisition (DIA) analysiert. Im Ergebnis konnte ein hochauflösendes Proteom peripherer porziner CD4<sup>+</sup> T-Zellen erstellt werden, welches Unterschiede zwischen den Phänotypen auf molekularer Ebene widerspiegelt.

Insgesamt ergab die massenspektrometrischen Analyse 2704 identifizierte Proteine, mit mindestens zwei Peptiden, die für die Quantifizierung genutzt wurden (unique peptides  $\geq 2$ ).

### **4.5.2 Differentielle Proteinabundanzen bei peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus INS<sup>C94Y</sup> transgenen Schweinen**

Von den 2704 identifizierten Proteinen des porzinen CD4<sup>+</sup>-Proteoms konnten 80 Proteine als signifikant unterschiedlich abundant zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen identifiziert werden ( $p \leq 0,05$ ). Ihr Anteil betrug 3% aller identifizierten Proteine. Abbildung 4.16 zeigt die signifikant unterschiedlich abundanten Proteine zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen und die hierarchische Clusteranalyse der fünf Wildtypen und vier INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine. Einunddreißig Proteine wiesen in den CD4-Proben der Wildtypen eine höhere Abundanz im Vergleich zu den CD4-Proben der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine auf, wohingegen 49 Proteine eine höhere Abundanz in den CD4-Proben der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine im Vergleich zu den CD4-Wildtyp-Proben zeigten.

## Ergebnisse

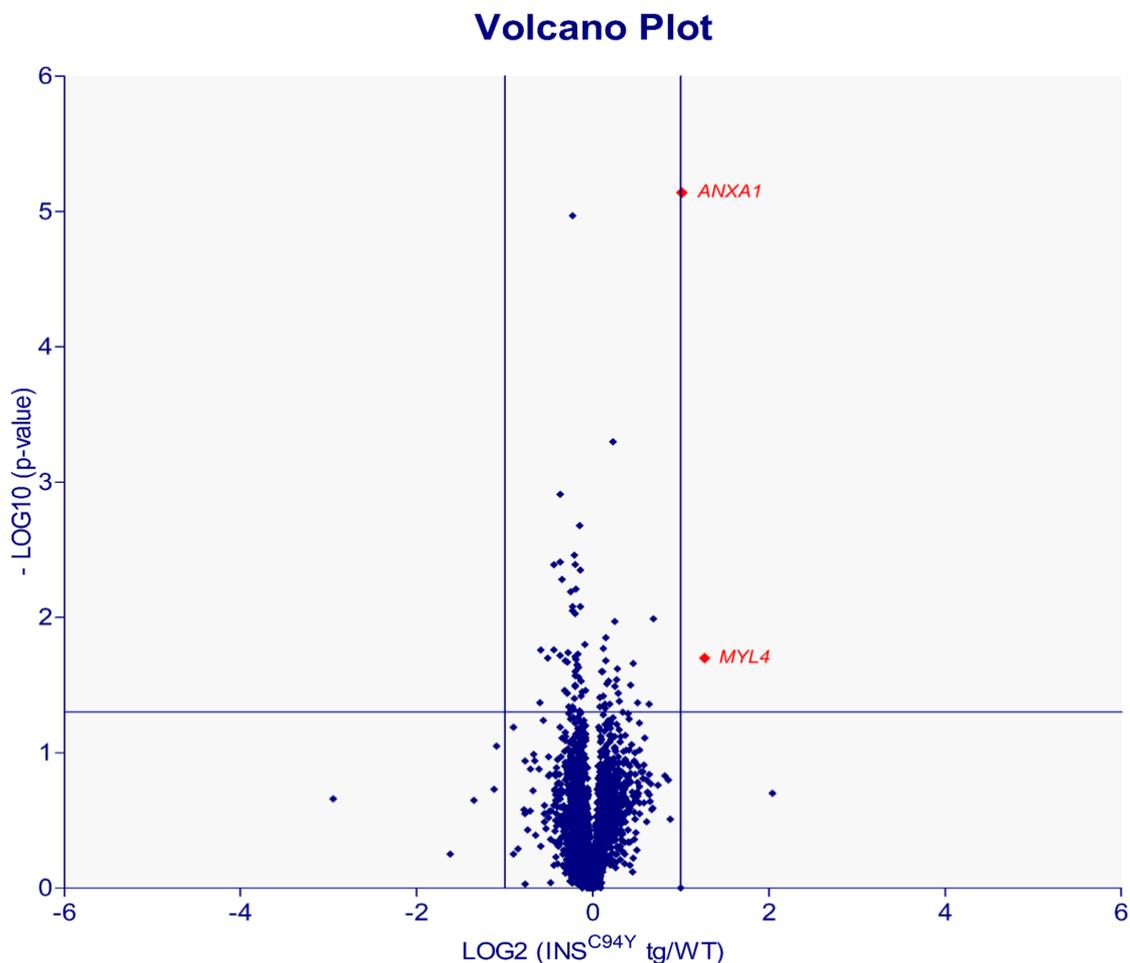


**Abbildung 4.16 Hierarchische Clusteranalyse signifikant unterschiedlich abundanter Proteine porciner CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen mittels DIA LC-MS/MS**

Die Heatmap zeigt die 80 signifikant unterschiedlich abundanten Proteine ( $p \leq 0,05$ ; Student's *t*-Test) peripherer CD4<sup>+</sup> T-Zellen von fünf Wildtypen (WT) und vier diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (INS). Die tierindividuellen Proteinabundanzen sind farblich dargestellt. Die Intensität der Farbgebung entspricht der Abweichung der Einzelprobe vom Medianwert aller Proben. Eine höhere Abundanz ist in gelb, eine geringere Abundanz in blau dargestellt. Die Proteinprofile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen und von INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen sind hierarchisch nach ihren Phänotypen geclustert.

### 4.5.3 Identifizierung von Kandidatenproteinen

Um Kandidatenproteine des porcinen CD4<sup>+</sup>-Proteoms für weitere Verifikationen zu bestimmen, sollten Proteine identifiziert werden, die mindestens eine 2-fach differentielle Proteinabundanz mit statistischer Signifikanz aufwiesen. Im Volcano Plot (Abbildung 4.17) ist gezeigt, dass aus der Gesamtheit aller identifizierten Proteine nur zwei Proteine als mindestens 2-fach differentiell sowie mit einer statistischen Signifikanz unterschiedlich abundant auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen identifiziert werden konnten. Es handelte sich dabei um die Proteine Myosin light chain 4 (Myl4) und um Annexin A1 (AnxA1).



**Abbildung 4.17** Differentielle Proteinabundanzen porciner CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen mittels DIA LC-MS/MS

Der Scatterplot illustriert das zweidimensionale Verhältnis von statistischer Signifikanz p-Wert < 0,05 (horizontale Linie) und einer mindestens 2-fach differentiellen Proteinabundanz (vertikale Linien). Der Großteil der identifizierten Proteine überschreitet die Grenzwerte nicht. Nur zwei Proteine entsprechen einer mindestens 2-fach differentiellen Proteinabundanz mit statistischer Signifikanz. Es handelt sich dabei um die Proteine Myosin light chain 4 (Myl4) und Annexin A1 (AnxA1).

## Ergebnisse

Das Protein Myosin light chain 4 zeigte bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen der diabetischen Schweine eine 2,4-fach höhere Abundanz im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Wildtypen (\*p=0,02). Es handelt sich dabei um eine leichte Kette des Myosins, einem Motorprotein mit ATPase Aktivität, welches in allen eukaryotischen Zellen exprimiert wird und Funktionen bei der Zelladhäsion und der Endo- und Exocytose erfüllt (Heissler and Sellers 2014).

Proteinname <sup>a</sup>	Gensymbol <sup>b</sup>	Accession Nummer <sup>c</sup>	Faktor C94Y/WT <sup>d</sup>	p-Wert <sup>e</sup>
Myosin light chain 4	MYL4	ENSSSCP00000018340	2,4	0,02
Annexin A1	ANXA1	ENSSSCP00000005658	2,0	0,00001

**Tabelle 1 Massenspektrometrisch identifizierte, differentiell abundante Proteine bei CD4<sup>+</sup>T-Zellen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine**

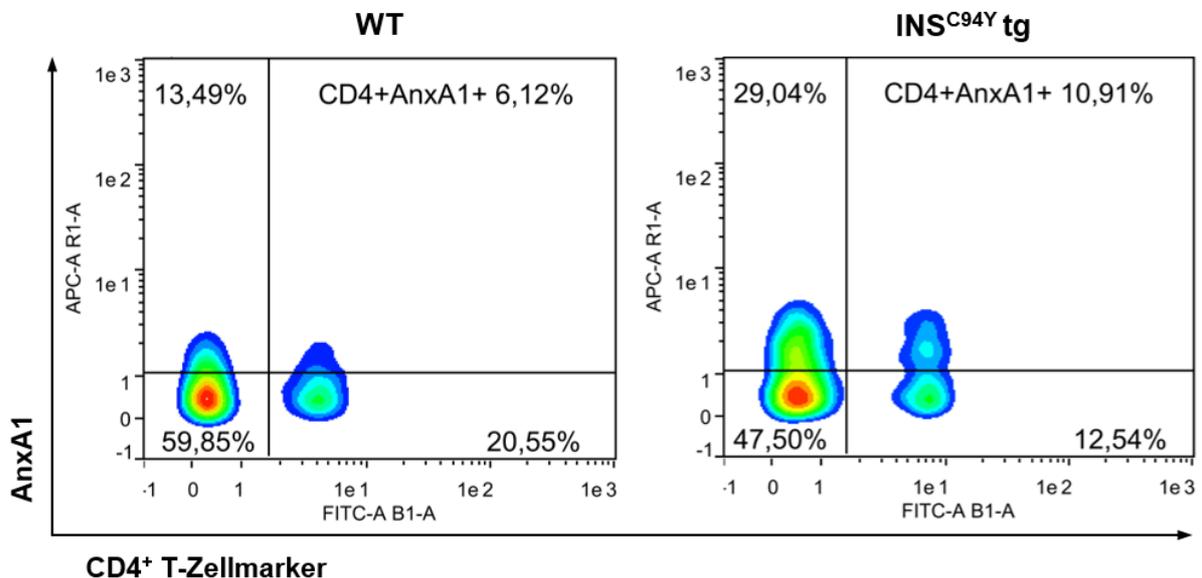
a) Name des identifizierten Proteins, b) korrespondierender Genname, c) Identifizierungsnummer des Proteins aus der Ensembl-Datenbank, d) Faktor C94Y/WT: Quotient aus dem Mittelwert der Proteinabundanzen der identifizierten Proteine von INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen und Wildtypen (INS<sup>C94Y</sup> tg/ WT), e) p-Wert (Student's *t*-Test): Statistischer Vergleich des Mittelwertes der Proteinabundanzen zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen.

Besonders interessant war die Identifikation von Annexin A1, das ebenfalls auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine als höher abundant nachgewiesen wurde. Mit hoher statistischer Signifikanz (\*\*p=0,00001) konnte dieses Protein mit einer 2-fach differentiellen Proteinabundanz auf den porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Wildtypen und diabetischen Schweine identifiziert werden. Interessanterweise wurde dieses Protein bereits in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit einer humanen diabetogenen Stoffwechsellage assoziiert. Erhöhte Annexin A1-Werte wurden im Plasma von Typ 1- Diabetespatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen (Purvis et al. 2018) sowie ebenfalls im Plasma von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben, in denen zusätzlich eine positive Korrelation zwischen erhöhten Annexin A1-Werten und einer Dyslipidämie festgestellt werden konnte (Purvis et al. 2019). Nichtsdestotrotz ist die biologische Funktion und die Konsequenz gesteigerter Annexin A1-Werte im diabetischen Geschehen bisher ungeklärt (Purvis, Solito, and Thiernemann 2019). In T-Zellen wurden erhöhte Annexin A1-Konzentrationen nach

T-Zell-Aktivierung festgestellt (D'Acquisto, Merghani, et al. 2007). Da differentielle Proteinabundanzen von Annexin A1 in einem transgenen, diabetischen Schweinemodell bisher nicht beschrieben wurden (Recherche, Januar 2020), konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Verifikation von Annexin A1 in porzinen peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

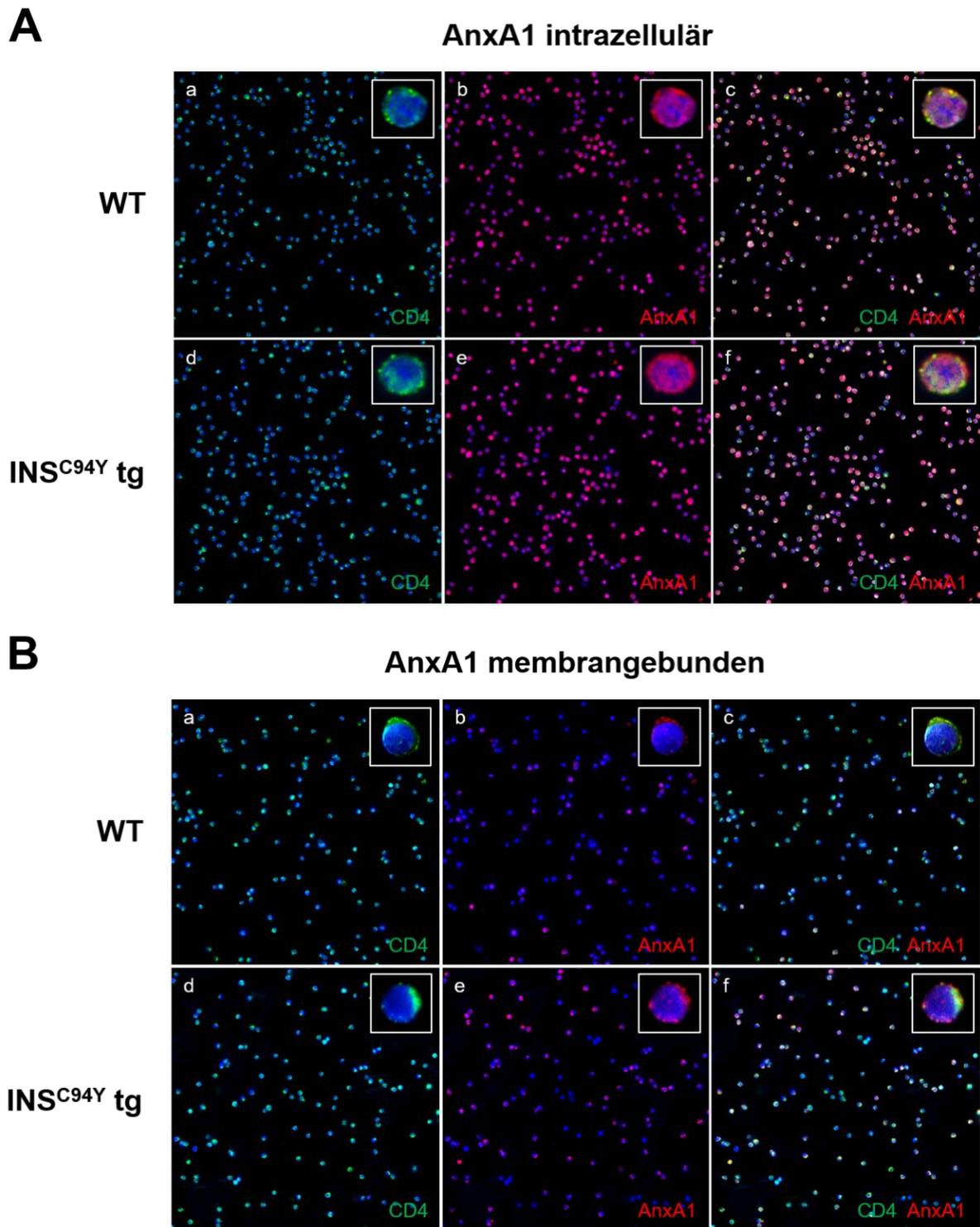
#### 4.6 Verifikation des Kandidaten Annexin A1

Die massenspektrometrische Identifikation des Proteins Annexin A1 sollte im Folgenden verifiziert werden. Dafür wurde in porzinen PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen der Anteil doppelt positiver CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup>T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Der Mittelwert des Anteils der CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup> T-Zellen betrug bei den Wildtypen 6,9% ± 2,9% (n=11) und bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=9) 11,3% ± 6,4. Der Anteil doppelt positiver CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup> T-Zellen war in Wildtyp-PBMCs im Vergleich zum CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup> T-Zell-Anteil in diabetischen PBMCs signifikant reduziert (\*p<0,05). Das Ergebnis bestätigte eine differentielle Annexin A1-Proteinexpression in den peripheren porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen. Es ist repräsentativ in Abbildung 4.18 dargestellt.



**Abbildung 4.18 Verifikation der erhöhten Expression von AnxA1 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen**  
 Exemplarisch ist ein Ergebnis doppelt positiver CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup>-Zellen von einem Wildtyp (WT, linker Dotplot) und einem INS<sup>C94Y</sup> tg Schwein (INS<sup>C94Y</sup> tg; rechter Dotplot) dargestellt. Der prozentuale Anteil der doppelt positiven CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup>-Zellen im oberen rechten Quadranten des Dotplots war bei Wildtypen (n=11) signifikant geringer als bei INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=9) (\*p<0,05; Student's t-Test).

Das vorwiegend intrazellulär lokalisierte Protein wird in humanen T-Zellen nach Aktivierung an die Membranoberfläche transloziert, um dann extrazellulär freigesetzt zu werden (D'Acquisto, Merghani, et al. 2007). Anhand der massenspektrometrischen Analyse konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob die höheren Proteinabundanzen bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen der diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine auf intrazelluläres oder membrangebundenes Annexin A1 zurückgeführt werden konnten. Deshalb sollte die Lokalisation des Annexin A1 mittels immunzytochemischer Markierung visualisiert werden. Abbildung 4.19 zeigt vergleichend positiv selektierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen von einem Wildtyp und einem INS<sup>C94Y</sup> tg Schwein, die mittels magnetischer Separation gewonnen wurden. Zum einen wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen dafür vor Inkubation eines anti-AnxA1-Antikörpers permeabilisiert, um intrazelluläre Epitope zugänglich zu machen (Abbildung 4.19 A) und zum anderen wurde auf eine Permeabilisierung verzichtet, um membranständiges Annexin A1 zu detektieren (Abbildung 4.19 B). Durch die Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) werden Zellkerne dunkelblau dargestellt, CD4-positive Zellen sind mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) grün markiert und Annexin A1 erscheint durch einen Alexa Fluor 647 konjugierten, sekundären anti-Maus IgG F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-Antikörper rot. Der anti-CD4-Antikörper (FITC-konjugiert) markierte nahezu alle Zellen als CD4-positiv und bestätigt eine hohe Reinheit der positiv selektierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A: a+d). Die intrazelluläre Annexin A1-Färbung ließ ein nahezu identisches Färbemuster von CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Wildtypen und des diabetischen Tieres erkennen. Es waren optisch keine quantitativen Unterschiede zu beobachten. Die Intensität positiver CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup>-Zellen war im Wildtyp und im diabetischen Tier gleich (A: b+e; c+f). Erstaunlicherweise zeigten im Gegensatz dazu die Ergebnisse der nicht-permeabilisierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich des positiven, membrangebundenen Annexin A1-Anteils eindeutige Unterschiede zwischen Wildtyp und diabetischem Schwein. Bei Betrachtung von Abbildung 4.19 B fällt ein quantitativ stärkeres rotes Signal der AnxA1-positiven Zellen in den diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und ein geringerer Anteil AnxA1-positiver Zellen in der CD4<sup>+</sup>- Population des Wildtypen auf. Es zeigte sich ein erhöhter Annexin A1-Anteil auf der Zelloberfläche diabetischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen.



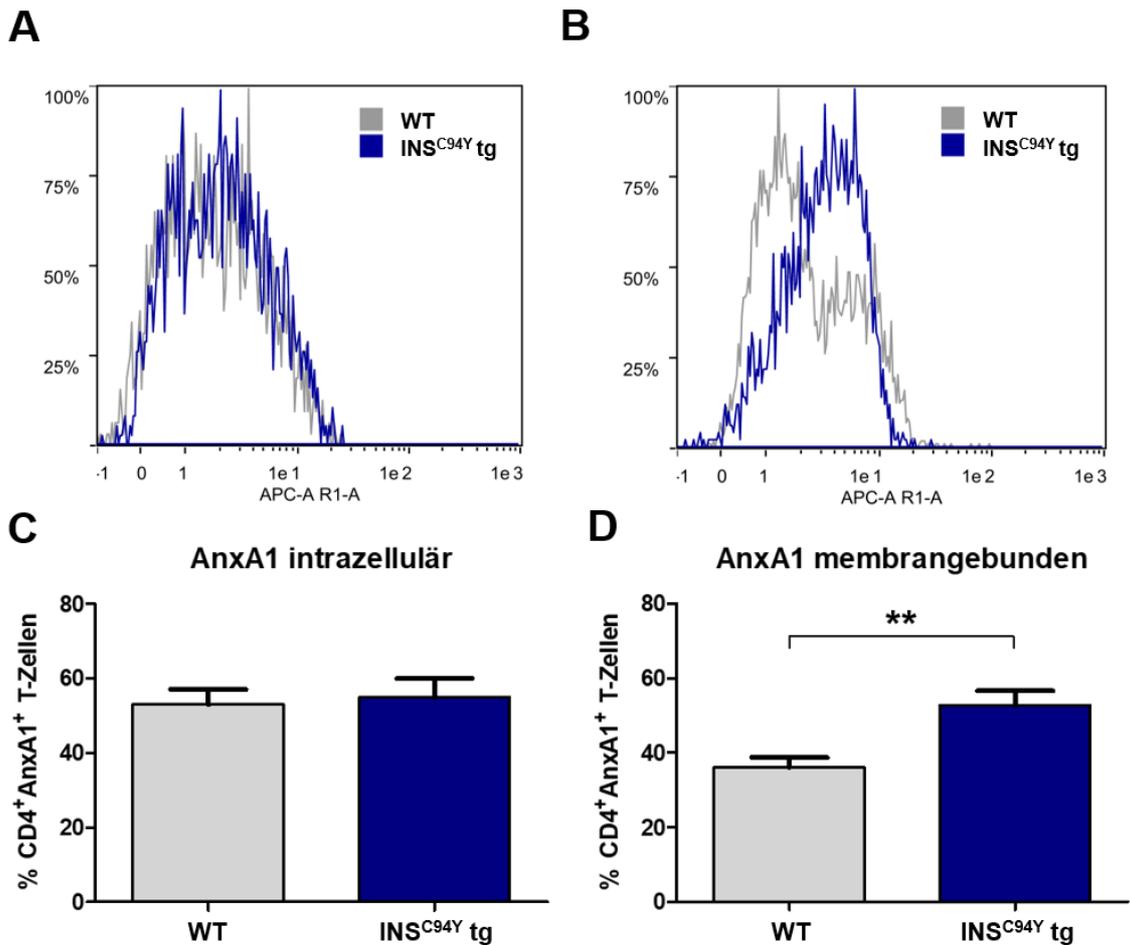
**Abbildung 4.19 Expression von Annexin A1 bei porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Mittels immunzytochemischer Markierung ist exemplarisch der Anteil AnxA1-positiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen eines Wildtypen (WT; a-c) und eines INS<sup>C94Y</sup> tg Schweins (INS<sup>C94Y</sup> tg; d-f) intrazellulär (A) und an der Zelloberfläche (B) vergleichend dargestellt. Zellkerne sind mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) dunkelblau gefärbt, CD4-positive Zellen sind grün (CD4; FITC) und AnxA1-positive Zellen rot (AnxA1; Alexa Fluor647) markiert. Bei der Betrachtung der intrazellulären Färbung zeigt sich ein einheitliches Färbemuster von Annexin A1 bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Wildtypen und des diabetischen Tieres. Im Vergleich dazu zeigt die Markierung von Annexin A1 an der Zelloberfläche ein deutlich unterschiedliches Bild. Es fällt auf, dass der Annexin A1-Anteil auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen des diabetischen Schweins deutlich höher im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Wildtypen ist.

Anschließend sollten die Beobachtungen der immunzytochemischen Markierung, die auf prozentuale Unterschiede des intrazellulären oder membrangebundenen Annexin A1-Anteils zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen hinwiesen, mittels Durchflusszytometrie bestätigt und statistisch beurteilt werden.

Es konnten auch in der durchflusszytometrischen Analyse von Wildtyp- und diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen quantitative Unterschiede in der Annexin A1-Expression an der Zelloberfläche zwischen den porzinen Phänotypen festgestellt werden (Abbildung 4.20). Der Mittelwert der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die Annexin A1 intrazellulär exprimierten, betrug bei den Wildtypen 61,5% ± 1,5% (n=4) und bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen 60,5% ± 8,5% (n=4) und unterschied sich demzufolge nicht zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen und diabetischen Schweinen (Abbildung 4.20 A+C). Der Anteil des membrangebundenen Annexin A1-Anteils war bei den diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 52,7% ± 8,6% (n=6) jedoch signifikant höher als bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen mit 36,1% ± 5,9% (n=6) (\*\*p=0,009; Abbildung 4.20 B+D).

Insgesamt konnte also eine selektive differenzielle Proteinabundanz von Annexin A1 bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen durch einen erhöhten Anteil von Annexin A1 auf der Zelloberfläche diabetischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestätigt werden.



**Abbildung 4.20** Selektiv differenzielle Expression von Annexin A1 bei porcinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Durchflusszytometrisch wurde die Expression von Annexin A1 intrazellulär und auf der Zelloberfläche porciner CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. (A) Das Histogramm zeigt repräsentativ, dass sich die intrazelluläre AnxA1-Expression in porcinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen Wildtyp und INS<sup>C94Y</sup> tg Schwein nicht unterscheidet. Im Unterschied dazu, sind in (B) eindeutige Unterschiede der AnxA1-Expression auf der Zelloberfläche vom Wildtyp und INS<sup>C94Y</sup> tg Schwein zu erkennen. (C+D) Dargestellt ist der Mittelwert (+ Standardfehler, SEM) der positiven CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen (WT) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (INS<sup>C94Y</sup> tg). Die statische Auswertung ergab, dass sich die intrazelluläre Expression von Annexin A1 zwischen diabetischen (n=4) und Wildtyp-CD4<sup>+</sup> T-Zellen (n=4) nicht unterscheidet, wohingegen der Anteil des membrangebundenen Annexin A1 signifikante Unterschiede zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen (n=6) und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen (n=6) aufweist. Es konnte ein deutlich höherer Annexin A1-Anteil an der Membranoberfläche diabetischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden (\*\*U-Test p=0,009).

Insgesamt konnte mittels immunzytochemischer und durchflusszytometrischer Methoden die massenspektrometrische Identifikation einer differenziellen Annexin A1-Abundanz zwischen peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen näher charakterisiert werden. Im Ergebnis wurde ein signifikant erhöhter Anteil von Annexin A1 auf der Zelloberfläche diabetischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen festgestellt.



## 5 DISKUSSION

Diabetes mellitus ist durch eine chronische Hyperglykämie gekennzeichnet, die neben zahlreicher Folgeerkrankungen auch Immunfunktionen wesentlich beeinflussen kann (Von Ah Morano et al. 2020). Obwohl die Mechanismen und das Ausmaß der Glukosetoxizität auf Immunzellen bisher nicht vollständig geklärt sind, ist ein Zusammenhang eines hyperglykämischen Milieus und einer Dysfunktion von Immunzellen, sowie der Entwicklung einer inflammatorischen Komponente von mehreren Autoren beschrieben (Kumar, Natarajan, and Shanmugam 2014; Palmer et al. 2016; Hu et al. 2018).

Im translationalen Tiermodell können die durch eine diabetogene Stoffwechsellage beeinflussten Immunmechanismen untersucht werden. Genetische Modifikationen von Schweinen erlauben es dabei, diabetische Fragestellungen des Menschen auf molekularer und funktionaler Ebene präzise in diese Spezies zu übertragen (Wolf et al. 2014).  $INS^{C94Y}$  tg Schweine stellen ein Modell für den Mutant INS gene-induced Diabetes of Youth dar (Renner et al. 2020). Die  $INS^{C94Y}$  tg Schweine exprimieren eine mutierte Insulinvariante, die auch in MIDY-Patienten beschrieben werden konnte und die durch die Funktionslosigkeit des Moleküls zu chronischem oxidativen Stress im Endoplasmatischen Retikulum und damit final zur Apoptose von  $\beta$ -Zellen führt (Renner et al. 2013). Ein diabetischer Phänotyp manifestiert sich nach wenigen Tagen als permanenter, neonataler Diabetes mellitus mit absoluter Insulindefizienz und persistierender Hyperglykämie (Renner et al. 2013). Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) exprimieren Rezeptoren für Insulin auf ihrer Zelloberfläche, weshalb sich eine molekulare Veränderung des Liganden Insulin durch Mutation auf die Rezeptor-Ligand-Interaktion und damit auf die Immunzellfunktionen auswirken kann (Von Ah Morano et al. 2020). Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst die PBMCs von  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen im Vergleich zu nicht-transgenen Wildtypen hinsichtlich ihrer Lymphozytenpopulationen, ihres Metabolismus und ihrer Proliferationsmöglichkeiten untersucht werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass T-Zellen in der Pathogenese des Diabetes mellitus eine besondere Schlüsselfunktion einnehmen (Radenkovic et al. 2016; Liu et al. 2017; Zhou et al. 2018), wurden darüber hinaus die porzinen  $CD4^+$  T-Zellen dieser diabetischen Schweine auf molekularer Ebene genauer charakterisiert.

Die anfängliche Untersuchung der PBMCs aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen sollte mithilfe einer durchflusszytometrischen Phänotypisierung fundamentale Unterschiede in den prozentualen Anteilen der peripheren B- und T-Lymphozyten aufdecken oder ausschließen. Zusätzlich wurde die altersabhängige Entwicklung von B- und T-Zell-Populationen in den beiden Phänotypen verglichen.

Weder in der 4., noch in der 8. oder in der 12. Lebenswoche konnten signifikante Unterschiede der peripheren B- oder T-Zell-Populationen zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen gemessen werden (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen bei Diabetes mellitus Typ-2-Patienten überein, bei denen keine abweichenden Lymphozytenpopulationen nachgewiesen werden konnten (Francisco et al. 2016; Olson et al. 2015). Bei den PBMCs der Wildtyp- und diabetischen Schweine war darüber hinaus ein leichter Rückgang des B-Zell-Anteils sowie ein leichter Anstieg des T-Zell-Anteils in der 12. Lebenswoche festzustellen. Diese Verschiebung der Lymphozytenpopulationen mit einer altersabhängigen Reduzierung des B-Zell-Anteils sowie einem Anstieg des T-Zell-Anteils wurden auch von anderen Autoren im Schwein beschrieben (Sipos 2019; Sinkora and Butler 2016). In einer Studie zur Populationsbestimmung porziner PBMCs wiesen 3 bis 6 Wochen alte Ferkel einen dreifach höheren B-Zell-Anteil, aber einen deutlich geringeren T-Zell-Anteil im Vergleich zu erwachsenen Sauen auf (Sipos 2019). Der B-Zell-Anteil bei diesen Ferkeln war mit etwa 26% und der T-Zell-Anteil mit etwa 65% (Bauer et al. 2018) vergleichbar mit den ermittelten Populationen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ferkel dergleichen Altersgruppe (Abbildung 4.1). Der erhöhte Anteil zirkulierender B-Zellen in der 4. Lebenswoche könnte in einer hohen Lymphogenese im Knochenmark begründet sein, um durch Aktivierung naiver B-Zellen und Differenzierung zu Plasmablasten, Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen eine stabile humorale Immunantwort ausbilden zu können. In der 12. Lebenswoche konnte eine leichte Reduzierung des B-Zell-Anteils festgestellt werden. Damit verbunden könnte die vermehrte Differenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen sein, die nicht im Blut zirkulieren, sondern im Knochenmark zu finden sind (Sipos et al. 2011). Der Anstieg der T-Zellen in der 12. Lebenswoche sowohl bei Wildtypen als auch bei INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen könnte unter anderem auf einen erhöhten Anteil der CD3<sup>+</sup>γδT-Zellen zurückzuführen sein. Diese Population steigt in den ersten 19 bis 25 Lebenswochen junger Schweine an (Saalmueller 2016). Auch bei den hier untersuchten Ferkeln wurde der höchste Anteil an γδT-Zellen in der 12. Lebenswoche

gemessen, wobei kein prozentualer Unterschied zwischen den Phänotypen festzustellen war. Neben der Identifizierung durch SWC5, können  $\gamma\delta$ T-Zellen noch mit dem Differenzierungsantigen CD2 bestimmt werden (Sedlak et al. 2014). Eine Untersuchung porciner T-Zellen identifizierte die drei  $\gamma\delta$ T-Zell-Phänotypen  $CD3^+CD2^-SWC5^-$ ,  $CD3^+CD2^-SWC5^+$  und  $CD3^+CD2^+SWC5^-$  (Talker et al. 2013). Das würde bedeuten, dass nur ein Teil der  $\gamma\delta$ T-Zellen bei den hier untersuchten Ferkeln detektiert wurde und ein größerer Teil von  $\gamma\delta$ T-Zellen in den PBMCs zu finden sein müsste. Erhöhte Anteile mit über 50%  $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb der  $CD3^+$  T-Zellpopulation wurden im Blut junger Schweine bereits in mehreren Untersuchungen beobachtet (Takamatsu et al. 2006; Talker et al. 2013; Sinkora and Butler 2016). Eine durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung von  $CD2^+$   $\gamma\delta$ T-Zellen könnte die Population der  $\gamma\delta$ T-Zellen erweitern.

Die  $\alpha\beta$ T-Zellen wiesen ebenfalls keine Unterschiede im Anteil zirkulierender Subpopulationen zwischen den untersuchten Phänotypen auf. Der Anteil der peripheren  $CD4^+$  T-Zellen blieb sowohl bei den Wildtypen, als auch bei den diabetischen Schweinen mit einem leichten Abfall in der 8. Lebenswoche relativ konstant in allen Altersgruppen (siehe Kapitel 4.1.2). Hier wäre es nun interessant, die  $CD4^+$  T-Zellen genauer zu phänotypisieren, um ihre Differenzierungs- und Funktionszustände zu unterscheiden. So könnte eventuell eine unterschiedliche Verteilung von T-Helferzellsubtypen zwischen Wildtyp- und diabetischen Schweinen ausgemacht werden, wie sie in anderen Diabetesstudien differenzierter  $CD4^+$  T-Zellen im Menschen festgestellt wurde (Touch, Clement, and Andre 2017; Walker and von Herrath 2016). Verschiedene Untersuchungen wiesen erhöhte Anteile von proinflammatorischen Th1-, Th17- oder Th22-Zellen im Blut von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nach (McLaughlin et al. 2014; Zhao et al. 2014). Es wäre deshalb interessant, durch die Bestimmung spezifischer Transkriptionsfaktoren die T-Helferzellpopulationen der Schweine im Vergleich zu bestimmen. So könnten beispielweise regulatorische T-Zellen im Schwein, ebenso wie im Menschen und in der Maus, durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 identifiziert werden (Käser et al. 2015). Ein erhöhter Anteil von T-bet $^+CD4^+$ T-Zellen, die im Menschen und in der Maus Th1-Zellen darstellen, wurde in Schweinen nach einer experimentellen Infektion mit dem Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom-Virus nachgewiesen, wohingegen sich nach einer parasitären Infektion mit *Trichuris suis* GATA-3 $^+CD4^+$ T-Zellen vermehrt ausdifferenzierten, die mit den humanen und murinen Th2-Zellen

vergleichbar sind (Ebner et al. 2014). Somit könnten diese Transkriptionsfaktoren ebenfalls als Differenzierungsmarker für verschiedene T-Helferzellsubtypen im Schwein verwendet werden (Ebner et al. 2014).

Die CD8 $\alpha$ -positive Population zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Phänotypen in den Altersgruppen, allerdings bei allen Ferkeln einen leichten Rückgang in der 12. Lebenswoche (siehe Kapitel 4.1.2). Das Differenzierungsantigen CD8 findet sich beim Schwein nicht ausschließlich auf zytotoxischen CD8 $^+$  T-Zellen, die durch eine CD8 $\beta$ - sowie eine hohe CD8 $\alpha$ -Expression charakterisiert sind (Gerner, Kaser, and Saalmuller 2009). CD8 $\alpha$  wird darüber hinaus ebenfalls von einer Subpopulation  $\gamma\delta$ T-Zellen (Sedlak et al. 2014), von natürlichen Killerzellen (Gerner, Kaser, and Saalmuller 2009) und nach Antigenkontakt von CD4 $^+$  T-Zellen exprimiert, welche dann differenzierte, doppelt positive CD4 $^+$ CD8 $\alpha^+$  T-Zellen darstellen (Gerner et al. 2015). Deshalb ist das Ergebnis einer leichten Reduzierung dieser Population in der 12. Lebenswoche überraschend, da beispielsweise die doppelt positiven CD4 $^+$ CD8 $\alpha^+$  T-Zellen in den Untersuchungen altersabhängig anstiegen (siehe Kapitel 4.1.2), so wie es auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (Gerner et al. 2015). Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte in einer reduzierten Population von natürlichen Killerzellen liegen, deren Maxima in einer anderen Studie bei jungen Ferkeln in der 5. und 7. Lebenswoche, gefolgt von einem steilen Abfall in der 9. Lebenswoche bestimmt werden konnten (Talker et al. 2013) und die ebenfalls das Differenzierungsantigen CD8 $\alpha$  auf ihrer Zelloberfläche tragen (Saalmuller et al. 1987).

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass sich die Lymphozyten signifikant hinsichtlich ihrer Populationen oder Subpopulationen zwischen Wildtyp- und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen unterschieden, sollten im Folgenden funktionelle Abweichungen der Immunzellen überprüft werden. Es bestand die Möglichkeit, dass die Lymphozyten der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine metabolisch von den Wildtyp-Lymphozyten abwichen. Aus diesem Grund schlossen sich Untersuchungen zum zellulären Metabolismus der porzinen PBMCs zur Zell-Charakterisierung an, der wesentlich zur Zellfunktion von Immunzellen beiträgt (Ayres 2020). Immunzellen, deren Umgebung verändert wurde, zeigten deutlich variierende Zellfunktionen hinsichtlich ihrer Lebensdauer, ihrer Signaltransduktion, ihrer Differenzierung und des Ablaufes einer Immunantwort (Buck et al. 2017; Pearce et al. 2013). Beispielsweise induziert Hypoxie im Gewebe eine Verschiebung von einer oxidativen zu einer anaeroben, glykolytischen Aktivität in

Immunzellen durch die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors HIF $\alpha$ , der als zentraler Transkriptionsfaktor die Transkription von Glukosetransportern und glykolytisch aktiven Enzymen reguliert (Wang and Solt 2016). In HIF-1 $\alpha$ -defizienten zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde diese Verschiebung zur Glykolyse unterbunden, woraufhin diese Zellen eine reduzierte Produktion zytolytischer Effektormoleküle und eine geringere Infiltration in hypoxisches Tumormilieu aufwiesen (Palazon et al. 2017). Durch die Modulation der beiden Hauptenergiegewinnungswege vieler Zellen, der Zellatmung im Mitochondrium und der Glykolyse im Zytosol, können wichtige Stellgrößen reguliert werden, um Zellen so umzuprogrammieren, dass sie ruhiggestellt oder zur Proliferation angeregt werden (Yin et al. 2015; Bettencourt and Powell 2017). Durch Messung des Sauerstoffverbrauchs von Immunzellen und der Ansäuerung des Mediums können Aussagen zur metabolischen Aktivität der Immunzellen gemacht werden (Zhang and Zhang 2019). Die Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate, OCR) erlaubt dabei eine Einschätzung der Mitochondrienaktivität im Sinne der mitochondrialen Respiration (Russell et al. 2019). Die Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) lässt demgegenüber durch die pH-Änderung des Mediums indirekt auf die glykolytische Aktivität der Zellen durch Laktatbildung schließen (Russell et al. 2019). Bei den Untersuchungen zum zellulären Metabolismus der PBMCs von diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg und Wildtyp-Schweinen konnten eindeutige Unterschiede in der mitochondrialen Respiration von PBMCs in der 12. Lebenswoche festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigten einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der diabetischen PBMCs hinsichtlich der basalen mitochondrialen Respiration, der ATP-gekoppelten Respiration, der Reservekapazität sowie der maximalen Respiration im Gegensatz zu den Wildtyp-PBMCs (Abbildung 4.9). Ebenso wiesen die diabetischen PBMCs in diesem Alter vergleichsweise eine höhere basale glykolytische Aktivität auf (Abbildung 4.12). Bei PBMCs aus diabetischen Patienten konnte ebenfalls eine erhöhte basale und maximale mitochondriale Respiration im Vergleich zu PBMCs aus Kontrollpersonen festgestellt werden (Hartman et al. 2014). Eine mögliche Begründung dieses Ergebnisses könnte in der Zunahme von oxidativem Stress in diabetischen PBMCs aufgrund der permanenten Hyperglykämie liegen, der eine Dysfunktion von Mitochondrien verursachen kann (Alfatni et al. 2020). Dysfunktionale Mitochondrien wurden in mehreren Studien in PBMCs diabetischer Typ 2-Patienten festgestellt (Czajka et al. 2015; Chen et al. 2017; Fetterman et al. 2016). Dementsprechend könnte es sein, dass die PBMCs der diabetischen Schweine

vermehrt oxidativem Stress durch das hyperglykämische Milieu ausgesetzt waren und aus diesem Grund eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate aufwiesen. Dieser oxidative Stress kann durch reaktive Sauerstoffspezies induziert werden (Seyyedehbrahimi et al. 2018). Diese entstehen unter anderem bei einer gesteigerten Stoffwechselrate der Atmungskette als mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (mtROS), die anschließend in die mitochondriale Matrix und in den Intermembranraum abgegeben werden und in geringer Konzentration wichtige Signalmoleküle sind, die viele immunologische Vorgänge und den Zellstoffwechsel beeinflussen (Senoner and Dichtl 2019). Eine Überschreitung dieser Konzentration sowie eine reduzierte, antioxidative Kapazität führt jedoch in den Zellen zu Zellschäden, welche in der Apoptose der Zelle münden können (Marrocco, Altieri, and Peluso 2017). Die Annahme einer pathologisch gesteigerten mtROS-Produktion würde bedeuten, dass die PBMCs der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine keine höhere Reservekapazität aufwiesen, sondern dass die Mitochondrien der PBMCs durch freie Sauerstoffradikale geschädigt wurden. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch ist vorwiegend an die ATP-Produktion gekoppelt, er kann aber auch entkoppelt von dieser durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erhöht sein (Hartman et al. 2014). Die maximale Respiration, die durch die Injektion mit FCCP als entkoppelte Respiration gemessen wurde, ist deshalb nicht mit einer ATP-Synthese gleichzusetzen (Divakaruni et al. 2014). Hierbei wird der Protonengradient entkoppelt und folglich der Sauerstoffverbrauch erhöht, aber eine Verknüpfung von Oxidation und Phosphorylierung an der ATP-Synthase unterbrochen (Doerrier et al. 2018). Demzufolge könnte eine Überproduktion von mtROS in den PBMCs der diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine den festgestellten, signifikant erhöhten Sauerstoffverbrauch im Gegensatz zu den Wildtyp-PBMCs erklären und die erhöhte entkoppelte Respiration gleichzeitig eine reduzierte ATP-Produktion durch eine Dysfunktion der Mitochondrien bedeuten.

Eine Analyse der mtROS in den porzinen PBMCs wäre aufgrund dieser Hypothese eine wertvolle Messung. Hierfür kann beispielweise die MitoSOX-basierte Methode genutzt werden, um mtROS in Zellen zu detektieren (Kauffman et al. 2016). Dabei wird der Farbstoff MitoSOX in den Mitochondrien durch Superoxide oxidiert, was im Durchflusszytometer oder der Immunzytochemie als rotes Fluoreszenzsignal gemessen werden kann (Kauffman et al. 2016). Eine Analyse der Mitochondrienmorphologie wäre ebenfalls eine Möglichkeit, Dysfunktionen der diabetischen PBMCs zu untersuchen und Schäden an der mitochondrialen

Membranstruktur zu erkennen. Diese sind besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress, wobei strukturelle und molekulare Schädigungen zu einer veränderten Membranpermeabilität führen können (Song et al. 2016). Der Schädigungsgrad der Mitochondrienmembran kann mit verschiedenen, spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen in der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden (Boudoures et al. 2017). T-Zellen von Diabetes Typ 1-Patienten wiesen neben der pathologisch erhöhten mtROS-Produktion ein erhöhtes mitochondriales Membranpotential auf (Chen et al. 2017; Widlansky et al. 2010). Dieses hyperpolarisierte Membranpotential, welches physiologischerweise reversibel in den Mitochondrien aktivierter T-Zellen auftritt, konnte in allen Subpopulationen der T-Zellen und unabhängig von deren Aktivierungs- und Differenzierungszuständen gemessen werden (Chen et al. 2017). Die Messung des Membranpotentials der Mitochondrien der T-Zellen beziehungsweise der PBMCs aus  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen und Wildtypen wäre eine Möglichkeit, dysfunktionale Mitochondrien in den diabetischen Schweinen genauer charakterisieren zu können. Eine Möglichkeit bietet auch hierbei eine durchflusszytometrische Untersuchung mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1, der in unterschiedlich fluoreszierenden Formen vorliegen kann (Widlansky et al. 2010). In hyperpolarisierten Mitochondrien bilden sich Aggregate und fluoreszieren rot, während die Emission von unter Depolarisation zerfallenden Monomeren als grüne Fluoreszenz detektiert wird (Perelman et al. 2012). Es wäre im Weiteren interessant, ob die Mitochondrien aus diabetischen PBMCs Änderungen in der Effizienz der Atmungskette und in ihrer ATP-Produktion aufweisen. In der zuvor genannten T-Zell-Studie der Typ 1-Patienten konnte eine basal niedrigere ATP-Produktion in den T-Zellen von Diabetespatienten festgestellt werden (Chen et al. 2017). Die ATP-Produktion der PBMCs von Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  tg Schweinen könnte mithilfe eines weiteren Tests, welcher ebenfalls über die Bestimmung der Sauerstoffverbrauchs- sowie der Azidifizierungsrate unter algorithmischer Berechnung die ATP-Syntheserate ermittelt, ebenfalls im Seahorse Analyzer gemessen werden (Passalacqua et al. 2019).

Eine gesteigerte mtROS-Bildung in T-Zellen muss nicht zwangsläufig eine pathologische Erscheinung sein, da durch diese wichtige Signalwege reguliert werden (Geltink, Kyle, and Pearce 2018). In Untersuchungen muriner T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien während der T-Zell-Aktivierung an der immunologischen Synapse positioniert werden, um ATP zu produzieren, den Kalziumeinstrom zu regulieren und mtROS zu generieren (Sena et al. 2013). In der

Folge war mtROS entscheidend an der erfolgreichen T-Zell-Aktivierung über die Aktivierung von Nuclear Factor of Activated T cells und an der anschließenden Induktion der Interleukin-2-Expression beteiligt (Sena et al. 2013). Es wäre deshalb ebenso möglich, dass sich in den PBMCs der diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine vermehrt aktivierte T-Zellen identifizieren lassen, die den hohen Sauerstoffverbrauch durch eine aktivierungsbedingte-mtROS-Bildung verursachen. T-Zellen steigern ihren Glukoseumsatz sobald sie aktiviert werden, um ihre metabolische Leistung zu erhöhen und anabole Prozesse zur Synthese von Zellmaterial und Effektormolekülen aktivieren zu können (van Niekerk, Davis, et al. 2019). Nicht-aktivierte, naive T-Zellen befinden sich in einem ruhenden Zustand und verwenden zur ATP-Generierung und Aufrechterhaltung der Homöostase vorwiegend die oxidative Phosphorylierung (Gaber et al. 2015). Nach Aktivierung werden vermehrt GLUT1-Glukosetransporter an die Zelloberfläche naiver T-Zellen transloziert, um durch eine erhöhte Glukoseaufnahme den Durchsatz der Glykolyse für das Zellwachstum und die Proliferation steigern zu können (Macintyre et al. 2014). Da Effektor-T-Zellen nach Umstellung des Stoffwechsels vorwiegend glykolytisch aktiv sind (Donnelly and Finlay 2015), könnte ein erhöhter Anteil an Effektor-T-Zellen in den PBMCs der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine auch die erhöhte basale glykolytische Aktivität der diabetischen PBMCs erklären. Diese Verschiebung zu einer höheren glykolytischen Aktivität beruht auch auf einer morphologischen Änderung der Mitochondrien wie der räumlichen Separation der Elektronentransportkomplexe, die eine Auflösung der Cristae-Strukturen bewirken und die Effektivität des Elektronentransports verringern (Buck et al. 2016). Die anfallenden Elektronen werden deshalb vermehrt für die Produktion von mtROS verwendet, die zur Verstärkung der T-Zell-Aktivierung beitragen (Fischer et al. 2018). Zur Identifizierung von aktivierten porzinen T-Zellen kann eine Kombination verschiedener Differenzierungsmarker wie CD8 $\alpha$ , SLA-DR, CD25, CD27, CD45RA, CD45RC und Ki67 in der Durchflusszytometrie untersucht werden (Gerner et al. 2015). Diese Hypothese einer erhöhten Zahl aktivierter T-Zellen in den diabetischen PBMCs muss jedoch kritisch mit Hinblick auf die Proliferationsdaten der Schweine bewertet werden. Denn während die Ergebnisse der stimulierten Lymphozyten mit PWM, PMA, BanLec und ConA keine Unterschiede in der gemessenen Proliferationsrate von Wildtyp-Lymphozyten und Lymphozyten aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen ergaben, zeigten die diabetischen Lymphozyten nach Stimulation mit dem T-Zell-Stimulanz PHA ein signifikant verändertes Proliferationsverhalten (Abbildung 4.13). Bei einer erhöhten

Zahl aktivierter T-Zellen in den diabetischen Schweinen wäre eine höhere Bildung von mtROS als Signalmolekül und eine höhere Proliferationsrate durch die Aktivierung von Nuclear Factor of Activated T cells sowie die anschließende Induktion der Interleukin-2-Expression zu erwarten gewesen (Sena et al. 2013). Dies war jedoch nicht der Fall, denn die Lymphozyten aus Wildtypen proliferierten nach Stimulation mit PHA im Ergebnis 5-fach stärker als die Lymphozyten der  $INS^{C94Y}$  tg Schweine. Interessanterweise wiesen PBMCs von Diabetes mellitus Typ 2-Patienten in einer früheren Studie ebenfalls eine reduzierte Proliferationsrate nach PHA-Stimulation auf, wobei eine reduzierte Anzahl von Interleukin-2-Rezeptor-positiven Zellen festgestellt werden konnte (Chang and Shaio 1995). Die Autoren sahen die Ursache einer verminderten Proliferation der diabetischen Zellen in einer Rezeptordefizienz und verminderten Wechselwirkung von Interleukin-2 und Interleukin-2-Rezeptor (Chang and Shaio 1995). In dem Datensatz der  $CD4^+$  T-Zellen, der im Rahmen dieser Arbeit generiert wurde, konnte Interleukin-2-Rezeptor, beziehungsweise CD25, nicht unter diesen beiden Namen auf den porzinen  $CD4^+$  T-Zellen gefunden werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass der Rezeptor unter einem anderen Namen im Datensatz identifiziert werden kann, was eine weitere Erforschung dieses Rezeptors notwendig macht. Eine aktuellere Studie wies nach Stimulation mit PHA zwischen metabolisch gesunden Patienten und Diabetes mellitus Typ 2-Patienten ebenfalls eine verminderte Interleukin-2-Produktion in den PBMCs der diabetischen Patienten nach (Richard et al. 2017). Trotz der vielfachen Nutzung von Kohlenhydratstrukturen-bindenden Pflanzenlektinen als Induktoren einer T- oder B-Zell-Proliferation durch deren immunstimulierende Eigenschaften (Carvalho et al. 2018), sind die genauen Mechanismen und Signalwege über die die Mitogene die Lymphozyten aktivieren und die Proliferation induzieren, weder bei Maus noch beim Menschen vollständig verstanden oder im Schwein näher beschrieben (PubMed Recherche Februar 2020). Da PHA in Untersuchungen von T-Zellen des Menschen oder der Maus ein hinreichend genutztes T-Zell-Stimulanz darstellt und bei diesen Zellen eine gesteigerte Interleukin-2-Expression und Zellproliferation induziert (Hu et al. 2019), wäre hier eine Untersuchung des Sekretoms der T-Zellen zur Bestimmung von Interleukin-2 eine Möglichkeit Abweichungen zwischen den Phänotypen ausmachen zu können. Da nur mit diesem Mitogen ein abweichendes Proliferationsverhalten der Lymphozyten induziert und unter Verwendung der weiteren Mitogene keine abweichende Proliferationsrate gemessen werden konnte, ist die grundlegende Untersuchung der

PHA-assoziierten Signalwege zu untersuchen. So ist es möglich, dass Signalwege, die durch PHA-Stimulation in T-Zellen aktiviert werden, in einer diabetogenen Stoffwechsellage verändert oder inhibiert sein könnten. In diesem Zusammenhang könnten auch abweichende metabolische T-Zell-Phänotypen bei Wildtypen und diabetischen Schweinen eine Rolle bezüglich der unterschiedlichen Proliferationsfähigkeit spielen. Der Blutglukosespiegel könnte sowohl die CD4<sup>+</sup>- als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen maßgeblich in der Ausprägung des metabolischen Phänotyps beeinflusst haben. Äußere Stimuli haben wesentlichen Einfluss auf die metabolische Umprogrammierung bei der Aktivierung von T-Zellen, wodurch dynamische Veränderungen in der Transkription und Translation ihrer Proteine hervorgerufen werden (Nyman et al. 2017). Je nach Differenzierung können Zellen einer Zellpopulation dabei eine hohe Heterogenität im metabolischen Phänotyp aufweisen, um spezifische Rollen in der Immunantwort einzunehmen (Rieckmann et al. 2017).

Sowohl die Unterschiede des zellulären Metabolismus als auch die reduzierte Proliferationsfähigkeit gaben Hinweise darauf, dass die PBMCs der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine und insbesondere die T-Zellen dieser diabetischen Tiere mit steigendem Alter und unter dauerhafter Hyperglykämie eine Dysregulation der Zellfunktion aufweisen könnten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen spezifischer untersucht. CD4<sup>+</sup> T-Zellen regulieren wichtige zelluläre und humorale Immunantworten, gewährleisten unter physiologischen Bedingungen die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase, beseitigen extra- und intrazelluläre Pathogene und inhibieren autoreaktive Immunantworten (Walker and von Herrath 2016). In zahlreichen Diabetesstudien wurden sie jedoch auch als eine der hauptverantwortlichen, immunologischen Initiatoren für das diabetische Krankheitsgeschehen sowohl in diabetischen Patienten als auch in diabetischen Nagermodellen bezeichnet (Baker et al. 2018; Previte and Piganelli 2018; Seyfarth et al. 2017; Knoop et al. 2020).

Beim Vergleich des zellulären Metabolismus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen konnten hinsichtlich ihrer mitochondrialen Respiration und ihrer glykolytischen Aktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen den Phänotypen festgestellt werden. Bei einer erhöhten Zahl von Effektor- oder Gedächtnis-CD4<sup>+</sup>-Zellen bei den diabetischen Schweinen wären in dieser Messung eindeutigere Unterschiede hinsichtlich einer erhöhten Sauerstoffverbrauchsrate oder Azidifizierungsrate bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine zu erwarten

gewesen. So wären zum einen die Effektor-CD4<sup>+</sup>T-Zellen vorwiegend glykolytisch aktiv und zum anderen würden Gedächtnis-CD4<sup>+</sup>T-Zellen bei Stoffwechselumstellung durch eine größere mitochondriale Masse und eine hohe oxidative Phosphorylierung gekennzeichnet sein (Geltink, Kyle, and Pearce 2018). Durch Bestimmung der OCR und ECAR der hier untersuchten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ließen sich im Vergleich keine Unterschiede in der metabolischen Funktion zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Wildtypen und diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine ausmachen.

Eine umfassendere Phänotypisierung dieser Zellen war durch die Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proteome möglich. Durch die Etablierung verschiedener omics-Technologien, wie beispielsweise Genomics, Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, Secretomics, konnten in den letzten Jahren wichtige Einblicke in zelluläre und immunregulative Prozesse ermöglicht werden (Wang et al. 2018). Differenzielle Proteomanalysen bieten so die Möglichkeit, die komplexen und dynamischen Veränderungen von Proteinen in Zellen widerzuspiegeln (Berge et al. 2019). Proteomanalysen von murinen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wiesen dabei einen eindeutigen Effekt von äußeren Stimuli auf den metabolischen Phänotyp einer Zelle auf (Howden et al. 2019). Um den Einfluss der chronischen Hyperglykämie auf das Proteom von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, wurde das Proteinrepertoire der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf molekularer Ebene zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen verglichen.

Im Ergebnis wurde durch die massenspektrometrische Analyse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus fünf Wildtypen und vier INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen ein hochauflösendes, porzines CD4-Proteom erstellt. Die Proteinprofile der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen der neun Schweine ergaben 2704 Proteinidentifikationen aus mindestens zwei quantifizierten Peptiden, gemessen mittels datenunabhängiger (DIA-) Akquisition (si. Kapitel 4.5.1). Der hier generierte Datensatz stellt zum einen die Erstbeschreibung eines CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proteoms im Schwein dar und beschreibt darüber hinaus als erste Proteomanalyse die Auswirkungen von erhöhter Blutglukose auf das CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proteom in einem diabetischen Schweinmodell (PubMed-Recherche Februar 2020). So wurde eine wertvolle Datenbasis generiert, die nützliche Erkenntnisse für die translationale Diabetes mellitus-Forschung liefern könnte. Es erwiesen sich 80 Proteine zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen als signifikant unterschiedlich abundant, wobei etwa 60% der Proteine eine höhere Abundanz in den CD4-Proben der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine im Vergleich zu den CD4-Wildtyp-Proben zeigten. Erstaunlicherweise

wiesen nur zwei der identifizierten Proteine eine mindestens 2-fach differentielle Proteinabundanz auf. Alle anderen signifikant unterschiedlich abundanten Proteine zeichneten sich durch geringgradig abweichende Abundanzniveaus aus. Es zeigten sich somit im Ergebnis wenige, eindeutige Unterschiede zwischen den generierten Proteomen. Das ist insofern interessant, als dass der Datensatz damit zeigte, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch unter hyperglykämischen Bedingungen ihr Proteinrepertoire nicht fundamental veränderten, sondern dass sie ihr Proteom an die Bedingungen anpassen konnten und nur einige, prägnante Proteine differentiell verändert waren. Eine proteomische Analyse von peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Diabetes mellitus Typ 1-Patienten und Kontrollpersonen ergab ein eindeutig inflammatorisches Proteinprofil dieser Zellen (Lepper et al. 2018). Interessanterweise war dies jedoch nicht auf eine Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen selbst, sondern vorwiegend auf zirkulierende, inflammatorische Mediatoren von Zellen des angeborenen Immunsystems zurückzuführen (Lepper et al. 2018). Die CD4<sup>+</sup> T-Zell-spezifischen Proteine hingegen, waren vereinzelt in den diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur geringfügig niedriger abundant, was auf einen leicht gedämpften Immunphänotyp hindeutete (Lepper et al. 2018). In der hier durchgeführten massenspektrometrischen Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der diabetischen Ferkel konnte kein inflammatorisches Proteinprofil festgestellt werden. So wurden weder charakteristische Transkriptionsfaktoren, noch T-Zell-spezifische Proteine wie der T-Zell-Oberflächenmarker CD3 oder T-Zell-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase als differentiell abundante Proteine identifiziert, die darauf hinweisen würden, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine vermehrt aktiviert wurden oder eine inflammatorische Signatur aufwiesen.

Bei einem der beiden Proteine handelte es sich um Myosin light chain 4. Dieses Protein zeigte bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der diabetischen Schweine, statistisch signifikant, eine 2,4-fach höhere Abundanz im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Wildtypen (siehe Tabelle 1). In einer vergleichenden RNA-Sequenzierung-Studie konnte in PBMCs von Diabetespatienten und Patienten mit rheumatoider Arthritis jeweils eine differentielle erhöhte Genexpression von Myosin light chain 4 gemessen werden (Niu et al. 2015). Da die PBMCs in dieser Studie im Gesamten untersucht wurden, ist jedoch unklar in welchem Zelltyp das Gen bei den diabetischen Patienten vermehrt exprimiert wurde (Niu et al. 2015). Im Rahmen des Human Protein Atlas Projektes wurde das Protein in der RNA-Sequenzierungsanalyse von PBMCs in plasmazytoiden dendritischen Zellen angereichert nachgewiesen (<https://www.proteinatlas.org>, Zeitpunkt der Abfrage: März

2020). In CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist bisher noch nichts zur Expression oder Funktion von Myosin light chain 4 publiziert (PubMed-Recherche Februar 2020). Beim Schwein und auch beim Menschen wird das Protein spezifisch in embryonalen Muskelzellen, sowie in Muskelzellen des Herzvorhofes exprimiert (Gregorich et al. 2017). Der Nachweis einer differentiellen Proteinabundanz von Myosin light chain 4 bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Schweins ist deshalb ein interessantes Ergebnis. T-Zellen benötigen nicht-muskuläres Myosin für ihre Zellmotilität (Krummel, Friedman, and Jacobelli 2014). Durch Regulierung dieser Motorproteine wird eine Vielzahl an Zellfunktionen hinsichtlich der Adhäsion, der Migration, des intrazellulären Transports, der Zytokinese und der Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst (Shutova and Svitkina 2018). Die leichten Ketten der nicht-muskulären Myosine, die mit Myosin heavy chains assoziiert sind, sind für die strukturelle Integrität des Myosins notwendig und können darüber hinaus über regulatorische, mechanoenzymatische Funktionen verfügen (Heissler and Sellers 2014). Es konnte jedoch weiterhin in Versuchen gezeigt werden, dass Myosin light chains auch isoliert im Zytosol vorliegen und weitere Bindungen eingehen können (Bajaj et al. 2009). Nicht-Myosin-Bindungspartner können etwa die Proteinkinase C, Proteinphosphatase 1 und weitere funktionell relevante Proteine sein, die dementsprechend in weitere Zellfunktionen wie der Translation, Signaltransduktion, Zellteilung und der Regulation des Aktomyosin-Zytoskeletts involviert sind (Heissler and Sellers 2014). Welche Funktion das differentiell abundante Myosin light chain 4 bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Wildtyp- und INS<sup>C94Y</sup> Schweine einnimmt, ist momentan noch unklar. Die Verfügbarkeit von freien Myosin light chains im Zytosol der CD4<sup>+</sup> T-Zellen könnte allerdings eine Erklärung für das differentiell abundante Myosin light chain 4 sein. So wurde keine weitere Untereinheit des Myosins als signifikant unterschiedlich abundant zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen identifiziert. Das Protein könnte demnach nicht-Myosin-gebunden in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorliegen und funktionell mit anderen Bindungspartnern interagieren. Die Funktion dieses Proteins bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen diabetischer Schweine sollte in zukünftigen Versuchen unbedingt untersucht werden. Durch den momentanen Mangel eines spezifischen Antikörpers gegen das Myl4-Antigen des Schweins und fehlender kreuzreaktiver Antikörper (Recherche Februar 2020), kann die weitere Untersuchung dieses Proteins erst erfolgen, wenn entsprechende Werkzeuge zur Verfügung stehen.

Bei dem zweiten identifizierten Protein, welches ebenfalls bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine als höher abundant nachgewiesen wurde, handelte es sich um Annexin A1 (siehe Tabelle 1). Mit hoher statistischer Signifikanz wies dieses Protein eine 2-fach differentielle Proteinabundanz zwischen den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der beiden Phänotypen auf. Dabei beweisen die farblich dargestellten Proteinabundanzen in der Heatmap eine konsequent hohe Proteinabundanz bei jeder einzelnen der vier CD4-Proben der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine und demgegenüber im Vergleich in allen fünf CD4-Wildtyp-Proben einheitlich niedrigere Proteinabundanzen. Dieses stetige Ergebnis lässt auf einen eindeutigen Zusammenhang mit dem Phänotyp der Schweine schließen.

Erhöhte Annexin A1-Werte wurden bereits in verschiedenen Studien mit einem Diabetes mellitus assoziiert. So konnten im Plasma von Diabetes mellitus Typ 1-Patienten erhöhte Annexin A1-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gemessen werden (Purvis et al. 2018). Im Serum adipöser Diabetes mellitus Typ 2-Patienten konnten im Vergleich zu schlanken Kontrollpersonen ebenfalls erhöhte Annexin A1-Konzentrationen und zudem erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine gemessen werden (Pietrani et al. 2018). Die Autoren konnten dabei eine positive Korrelation von Annexin A1 mit dem Body-Mass-Index und dem Bauchumfang der Personen erkennen und assoziierten die erhöhten Annexin A1-Werte mit einem Adipositas-bedingten, inflammatorischen Geschehen aufgrund der gesteigerten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (Pietrani et al. 2018). Dem widersprachen zum Teil die Autoren einer weiteren Studie, da sie in einem Patientenkollektiv von Typ-2-Diabetikern zwar ebenfalls erhöhte Werte zirkulierenden Annexin A1 im Plasma der Typ-2-Diabetiker, jedoch keine Korrelation von Annexin A1 und dem Body-Mass-Index und dem C-reaktivem Protein, als Indikator einer systemischen Inflammation, feststellen konnten (Purvis et al. 2019). Sie erklärten stattdessen eine positive Korrelation zwischen den erhöhten Annexin A1-Werten und gesteigerten Triglycerid-, Cholesterol- und Serum-LDL-Spiegeln sowie dem Fettleber-Index, als Maß der Lipidakkumulation in der Leber, und stellten die Hypothese einer gesteigerten Annexin A1-Synthese aufgrund der veränderten metabolischen Bedingungen hinsichtlich der Glukose- und Lipidhomöostase im Diabetes mellitus auf (Purvis et al. 2019). Die hier untersuchten, diabetischen Schweine waren nicht adipös, wiesen in der 12. Lebenswoche jedoch eine ausgeprägte Hypertriglyceridämie auf (Abbildung 3.2). Es wäre also interessant, eine ergänzende Messung der Annexin A1-

Konzentrationen in Serum und Plasma der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine und Wildtypen durchzuführen. So könnte weiterhin untersucht werden, ob erhöhte Annexin A1-Konzentrationen generalisiert bei den diabetischen Schweinen festgestellt werden können oder ob sich die Unterschiede zwischen den Phänotypen ausschließlich auf die Immunzellen und dort im Speziellen auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschränken. Sollte sich dieses Ergebnis nur auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Schweine beziehen, stellt sich die Frage, welche besondere Funktion das Protein in dieser Immunzellpopulation erfüllt. Annexin A1 ist ein Phospholipid-bindendes Protein, das durch Kalzium reguliert, multifunktionelle Eigenschaften im angeborenen und erworbenen Immunsystem hinsichtlich der Zellaktivierung, Proliferation, der Apoptose, der Differenzierung und der inflammatorischen Immunantwort aufweist (Sheikh and Solito 2018). In zuvor stimulierten T-Zellen wurde Annexin A1 als ein Modulator der T-Zell-Aktivierung charakterisiert, da eine Inkubation mit rekombinantem Annexin A1 *in vitro* die T-Zell-Aktivierung und die Signaltransduktion weiter verstärkte und die Zellen eine erhöhte Proliferationsrate aufwiesen (D'Acquisto, Merghani, et al. 2007). Die diabetischen PBMCs der Ferkel wiesen aber im hier durchgeführten Proliferationsversuch eine reduzierte Proliferationsrate nach Stimulation mit PHA auf, während die anderen verwendeten Mitogene keine abweichende Proliferationsfähigkeit induzierten. Hier sollte noch einmal eingehender das Proliferationsverhalten der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Ferkel und im Speziellen die Proliferationsfähigkeit von CD4<sup>+</sup>AnxA1<sup>+</sup> T-Zellen nach PHA-Stimulation analysiert werden. So könnte beispielsweise durch Inhibition von Annexin A1 untersucht werden, ob dies eine Normalisierung der Proliferationsrate in diabetischen Lymphozyten induzieren könnte und welchen Einfluss Annexin A1 in den porzinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Proliferationsfähigkeit hat.

In CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Menschen wurde Annexin A1 in RNA-Sequenzierungsstudien mit der höchsten Anreicherung in Gedächtnis-CD4<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen (Monaco et al. 2019). Das ist insofern interessant, als dass eine erhöhte Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen in den diabetischen Schweinen mit der erhöhten mitochondrialen Respiration der PBMCs aufgrund ihrer hohen mitochondrialen Masse übereinstimmen würde. Bei den Untersuchungen des zellulären Metabolismus der magnetisch separierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte dieser Unterschied jedoch nicht mehr gemessen werden, weshalb anzunehmen ist, dass die erhöhte Annexin A1-Abundanz nicht prinzipiell auf eine Erhöhung von Gedächtnis-CD4<sup>+</sup>-Zellen zurückgeführt werden sollte. Des Weiteren geben auch die Ergebnisse der CD4-Proteomik keine Hinweise darauf, dass die

diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen abweichend von den Wildtypen durch eine Gedächtnis-T-Zell-Signatur gekennzeichnet sind. Es wäre jedoch möglich, dass Annexin A1 ein für die T-Zell-Differenzierung relevantes Protein darstellt, das auch die Proliferationsfähigkeit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst.

Interessanterweise wurde in peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine signifikant erhöhte Annexin A1-Expression im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Kontrollpersonen nachgewiesen (D'Acquisto, Merghani, et al. 2007). Die rheumatoide Arthritis und Diabetes mellitus weisen als grundlegendes, gemeinsames Charakteristikum die Entwicklung eines chronisch, inflammatorischen Krankheitsgeschehens auf (Nicolau et al. 2017). In Untersuchungen von Genexpressionsprofilen von PBMCs aus Patienten mit rheumatoider Arthritis und Diabetes mellitus konnten mehrere Schnittstellen differentiell exprimierter Proteine sowie übereinstimmende Signalwege, die in beiden Erkrankungen beeinflusst waren, identifiziert werden (Niu et al. 2015). Trotzdem kann eine erhöhte Expression von Annexin A1 nicht zwangsläufig mit der Induktion einer inflammatorischen Immunantwort assoziiert werden. Aufgrund seiner diversen und teilweise gegensätzlichen Funktionen in immunologischen Prozessen wird Annexin A1 auch als „double-face“-Protein bezeichnet (Shao et al. 2019). So existieren neben den Untersuchungen, die Annexin A1 als positiven Verstärker einer T-Zell-Stimulation beschreiben (D'Acquisto, Paschalidis, et al. 2007; Huang et al. 2016), auch weitere Studien, die in Abwesenheit von Annexin A1 eine verstärkte T-Zell-Aktivierung und T-Zell-induzierte Inflammation feststellten (Yang et al. 2013). So induzierte Annexin A1 in verschiedenen *in vitro* Studien mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen eine Differenzierung zu inflammatorisch wirkenden Th1-Zellen sowie die Synthese proinflammatorischer Zytokine (D'Acquisto, Merghani, et al. 2007; Huang et al. 2016). In einer anderen Studie mit Mäusen führte jedoch die Abwesenheit des Proteins, das heißt Annexin A1-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zu einer verstärkten Antigen-induzierten Signaltransduktion, einem Anstieg der Zellproliferation und einer erhöhten Produktion von INF $\gamma$  und Interleukin-17A (Yang et al. 2013). Aufgrund dieser Ergebnisse kann nach dem jetzigen Stand der Forschung nicht eindeutig gesagt werden, ob Annexin A1 einen verstärkenden oder inhibitorischen Effekt auf T-Zellen hat (Bruschi et al. 2018).

Interessante Befunde ergaben sich durch die Verifikationsversuche des Kandidaten Annexin A1. Aus der massenspektrometrischen Analyse ging nicht hervor, ob die

höheren Proteinabundanzen bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen der diabetischen INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine auf ein bestimmtes Zellkompartiment zurückzuführen waren. Im Ergebnis der immunzytochemischen und durchflusszytometrischen Verifikationsversuche konnte überraschenderweise ein signifikant erhöhter Anteil von Annexin A1 auf der Zelloberfläche diabetischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtypen festgestellt werden, wohingegen sich intrazellulär exprimiertes Annexin A1 nicht zwischen den Phänotypen unterschied. Somit konnte keine generelle, sondern eine selektiv, differentielle Proteinexpression zwischen diabetischen und Wildtyp-CD4<sup>+</sup> T-Zellen an der Zelloberfläche bestätigt werden. Annexin A1 liegt intrazellulär, in membrangebundener oder sekretierter Form vor (Purvis et al. 2019). Als vorwiegend intrazellulär lokalisiertes Protein wird Annexin A1 kalziumabhängig an die Zellmembran gebunden (Perretti and D'Acquisto 2009). Sekretiertes Annexin A1 wirkt autokrin oder parakrin über G-Protein-gekoppelte Formylpeptidrezeptoren, um dessen spezifische Signalwege zu induzieren (Cattaneo, Parisi, and Ammendola 2013). Eine Sekretom-Analyse würde aufdecken, ob Annexin A1 vermehrt von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine sekretiert wird.

In T-Zellen werden sowohl Annexin A1 als auch der Formylpeptidrezeptor bei Aktivierung der Zellen verstärkt an die Zelloberfläche transloziert (D'Acquisto, Merghani, et al. 2007). Dies würde bedeuten, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der diabetischen Ferkel möglicherweise als Reaktion auf die erhöhte Blutglukose oder durch andere Mediatoren stimuliert wurden und deshalb verstärkt Annexin A1 an die Zelloberfläche translozierten. Ein Formylpeptidrezeptor konnte in der massenspektrometrischen Analyse nicht unter diesem Namen identifiziert werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass der G-Protein-gekoppelte Rezeptor unter einem anderen Namen identifiziert werden kann oder für die Bindung und Signaltransduktion von Annexin A1 im Schwein bisher noch unbekannt ist. Wichtige Regulationsprozesse der Annexin A1-Lokalisation stellen post-translationale Proteinphosphorylierungen dar (D'Acunto et al. 2014). So bestimmen Proteinkinasen durch die reversible Phosphorylierung von bestimmten Aminosäureresten des Annexin A1 die spezifischen Bindungseigenschaften und im Weiteren wesentlich die Multifunktionalität des Proteins (D'Acunto et al. 2014). Insbesondere die Serin-27-Phosphorylierung wies in Mausmodellen wichtige translozierende Eigenschaften auf, um den Transport von Annexin A1 an die Zelloberfläche zu regulieren und die Sekretion des Proteins zu ermöglichen (Wang et al. 2017). Diese Translokation ist dabei unabhängig von der klassischen Exozytose

über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat (Sheikh and Solito 2018). Durch eine Untersuchung des Phosphorylierungsstatus, die beispielsweise mittels geeigneter Antikörper gegen phosphoryliertes Annexin A1 im Western Blot erfolgen könnte, wäre eine Einschätzung darüber möglich, welche Phosphorylierungen von Annexin A1 in T-Zellen des Schweins eine Rolle spielen könnten. Hierbei wäre es auch interessant, in welcher Form das Protein sekretiert wird. Durch extrazelluläre Vesikel könnte vermehrt Annexin A1 an die Zelloberfläche der diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen transloziert oder sekretiert werden (Boudhraa et al. 2016). Diese werden durch bestimmte Zellsignale vermehrt aus der Zelle ausgestülpt beziehungsweise freigesetzt und stellen wichtige Boten der Zellkommunikation dar (Robbins, Dorronsoro, and Booker 2016). Eine veränderte Zusammensetzung dieser extrazellulären Vesikel sowie ein immunmodulierender Effekt auf Zielzellen wurde bereits mit Diabetes mellitus assoziiert (Pardo et al. 2018; Rutman et al. 2018). Mikrovesikel und Exosomen transportieren im Rahmen des interzellulären Materialtransports molekulare Informationen wie RNA, Lipide, Metabolite und eine Vielzahl von funktionell relevanten oder regulierenden Proteinen zu anderen Zielzellen, um an ihnen zu wirken (Huang-Doran, Zhang, and Vidal-Puig 2017). Je nach Inhalt der extrazellulären Vesikel können sie Immunantworten auf verschiedene Art und Weise verstärken oder supprimieren (Rutman et al. 2018). Extrazelluläre Vesikel spielen auch eine wichtige Rolle in der Immunregulation durch T-Zellen, indem sie Immunantworten der Zielzellen beeinflussen können (Anel et al. 2019). Annexin A1 kann zum einen mit diesen Vesikeln aus der Zelle externalisiert werden, zum anderen ist Annexin A1 auch Bestandteil der Exosomenoberfläche und ist nach Fusion mit der Zielzelle an dessen Oberfläche lokalisiert (Boudhraa et al. 2016). Im Kontext mit dem erhöhten Annexin A1-Anteil auf der Zelloberfläche der diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen könnte also durch erhöhte Exosomenbildung vermehrt Annexin A1 zur Zellkommunikation freigesetzt worden sein. Dieses Annexin A1 könnte wiederum autokrin oder parakrin wirken und entweder die T-Zell-Aktivierung verstärken oder aber auch antiinflammatorisch wirken (Boudhraa et al. 2016).

Zusammenfassend konnten durch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wichtige Erkenntnisse zur Immunreaktion eines diabetischen, translationalen Schweinemodells gewonnen werden. Während sich periphere Lymphozytenpopulationen nicht zwischen Wildtypen und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen unterschieden, wiesen die PBMCs der diabetischen Schweine in der 12. Lebenswoche

eindeutige Unterschiede in ihrer Funktion auf. Die Untersuchung des zellulären Metabolismus eröffnet enorme Möglichkeiten in der Identifizierung zelltypischer, metabolischer Charakteristika sowie dysfunktionaler Zusammenhänge. Eine weitere Möglichkeit, den Zellmetabolismus der Immunzellen von Wildtyp- und INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen unter basalen oder modulierten Bedingungen zu untersuchen, wäre eine massenspektrometrische Analyse von Zellmetaboliten. Die Untersuchung des Metaboloms erlaubt dabei die Aufklärung metabolischer Zusammenhänge, wobei Metabolite zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung einer Immunreaktion aus den Zellen extrahiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden können, um Signaltransduktions- und Stoffwechselwege noch genauer beurteilen zu können (Newgard 2017).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass das hyperglykämische Milieu den Zellstoffwechsel der PBMCs aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen im Vergleich zu Wildtyp-PBMCs eindeutig verändert hat. Da T-Zellen auf Umgebungsbedingungen mit einer metabolischen Umprogrammierung reagieren und eine große Diversität in ihrem metabolischen Phänotyp aufweisen können (Marchingo et al. 2020), könnte die Hyperglykämie bestimmte Immunzellphänotypen bei den T-Zellen der diabetischen Ferkel bedingt haben, die die gemessenen Unterschiede verursachten. Auch die reduzierte Proliferationsfähigkeit der T-Zellen nach Stimulation mit PHA könnte auf Unterschiede im metabolischen Phänotyp und beeinflusster Signalwege zurückzuführen sein. Um mögliche Unterschiede auf molekularer Ebene feststellen zu können, wurden mithilfe der differentiellen Proteomanalyse hochauflösende Proteome von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen und Wildtypen erstellt. Der hohe signifikante Unterschied der Proteinabundanzen zwischen den Phänotypen machte Annexin A1 zu einem besonders interessanten Kandidaten der Analyse. Die übereinstimmend hohen Proteinabundanzen von Annexin A1 bei allen untersuchten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proben der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine sprechen für eindeutige Abweichungen hinsichtlich dessen Funktion zwischen den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der beiden Phänotypen. Da eine dysregulierte Annexin A1-Expression bereits in mehreren Untersuchungen mit einer diabetogenen Stoffwechsellage im Menschen assoziiert wurde, ist die Identifikation dieses Proteins in einem diabetischen, translationalen Schweinemodell hervorzuheben. Das Ergebnis eines selektiv differentiell exprimierten Annexin A1 besitzt aufgrund der komplexen Funktionalität dieses Proteins großes Potential für weitere Untersuchungen. Da bisher noch unklar

ist, ob Annexin A1 tendenziell pro- oder antiinflammatorisch auf T-Zellen wirkt (Sheikh and Solito 2018), sollten weitere Versuche erfolgen, die zum Verständnis der Proteinfunktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen beitragen. So existieren hierzu in der publizierten Literatur bislang absolut konträre Ergebnisse aus Mausmodellen (D'Acquisto, Merghani, et al. 2007; Yang et al. 2013). Welche Funktion Annexin A1 bei der Immunantwort von Schweinen einnimmt, ist bislang nicht untersucht (Pubmed-Recherche Februar 2020), weshalb die Identifizierung dieses Proteins bei diabetischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Hinblick auf den hohen signifikanten Unterschied zwischen den Phänotypen eine Basis für weitere Untersuchungen darstellt. Diese sind notwendig, um die komplexen und feinabgestimmten Immunmechanismen beurteilen zu können, die Annexin A1 in der Modulation einer T-Zell-Antwort ausübt. Insgesamt konnten in der Proteomanalyse keine Hinweise dafür gefunden werden, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine durch die erhöhte Blutglukose vermehrt aktiviert wurden oder fundamental in ihrem Proteinrepertoire von den Wildtyp-CD4<sup>+</sup> T-Zellen abwichen. Dies könnte zum einen auf gute Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung einer Zellhomöostase oder auf eine gewisse Toleranz gegenüber dem hyperglykämischen Milieu zurückzuführen sein. Zwar besitzt Insulin eine gewisse regulatorische und antiinflammatorische Wirkung auf Immunzellen (van Niekerk, Christowitz, et al. 2019), die bei den INS<sup>C94Y</sup> tg Schweinen entfällt, naive T-Zellen stellen allerdings insofern eine Ausnahme bei den PBMCs dar, als dass sie keine Insulinrezeptoren und wenig Glukosetransporter auf ihrer Oberfläche aufweisen (Fischer et al. 2017). Wäre also ein Großteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den jungen diabetischen Schweinen noch naiv, könnten die Auswirkungen der Hyperglykämie und des fehlenden Insulins auf die naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen selbst nur geringfügig sein. Insofern sollte die Frage beantwortet werden, ob Annexin A1 in allen Differenzierungs- und Funktionszuständen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gleiche Muster zeigt oder ob Unterschiede darin bestehen, welche CD4<sup>+</sup> T-Zellen Annexin A1 verstärkt an die Zelloberfläche translozieren oder sekretieren. Auf dieser Basis kann dann der mögliche Einfluss der Hyperglykämie auf eine erhöhte Annexin A1-Translokation bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der INS<sup>C94Y</sup> tg Schweine weiter untersucht werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Diabetes mellitus sowie die damit verbundenen, schwerwiegenden Komorbiditäten haben sich mit nahezu einer halben Milliarde betroffener Menschen und einer permanent steigenden Prävalenz weltweit zu einer der größten Public-Health-Herausforderungen entwickelt. Die chronische Hyperglykämie, die das Hauptcharakteristikum des Diabetes mellitus darstellt, nimmt wesentlichen Einfluss auf die Immunfunktionen und kann den Immunstatus der Patienten folgeschwer beeinträchtigen. Trotzdem sind die genauen Immunmechanismen, die als Folge der gestörten Glukosehomöostase die Immunantwort modulieren, noch immer in vielerlei Hinsicht ungeklärt. Für die translationale Diabetes mellitus-Forschung werden Tiermodelle für bestimmte diabetische Fragestellungen generiert. Während die häufig verwendeten Nagemodelle den diabetischen Phänotyp und die relevanten Krankheitsmechanismen oft nicht gut genug abbilden, gelten Schweine als vielversprechende Diabetesmodelle, da sie große Ähnlichkeit zum Menschen hinsichtlich anatomischer, physiologischer und immunologischer Merkmale aufweisen. Genetisch modifizierte  $INS^{C94Y}$  transgene Schweine stellen ein diabetisches Modell für eine monogenetische Diabetes mellitus-Erkrankung des Menschen dar, die durch ein Defizit der Insulinsekretion gekennzeichnet ist. Die  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine entwickeln innerhalb der ersten Lebenswochen einen diabetischen Phänotyp mit einer ausgeprägten Hypoinsulinämie sowie einer persistierenden Hyperglykämie.

Da Untersuchungen zum Immunsystem dieses diabetischen Modells bisher nicht durchgeführt wurden, war es das Ziel dieser Arbeit, die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen im Vergleich zu nicht-transgenen Wildtypen (Wurfgeschwister) in der 4., der 8. und der 12. Lebenswoche hinsichtlich der Lymphozytenpopulationen, des Metabolismus und der Proliferationsmöglichkeiten zu untersuchen. Im Weiteren wurden in der 12. Lebenswoche die peripheren  $CD4^+$  T-Zellen von diabetischen Schweinen und Wildtypen auf metabolischer und molekularer Ebene genauer charakterisiert.

Im Vergleich der Populationen der peripheren B- und T-Zellen sowie der T-Zell-Subpopulationen zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen in den drei Altersgruppen. Da Zellfunktionen eng mit dem zellulären Metabolismus verknüpft sind, erfolgte eine Untersuchung des metabolischen Potentials der porzinen PBMCs durch die Bestimmung der Aktivität von

mitochondrialer Respiration und glykolytischer Aktivität. Im Ergebnis zeigten die diabetischen PBMCs in der 12. Lebenswoche einen eindeutig erhöhten Sauerstoffverbrauch in den Mitochondrien zu allen Messzeitpunkten, sowie eine erhöhte basale glykolytische Aktivität. Zur weiteren Evaluierung einer potentiell abweichenden Funktionalität der diabetischen PBMCs wurde in dieser Altersgruppe das Proliferationsverhalten peripherer Lymphozyten aus Wildtypen und  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen untersucht. Das T-Zell-Stimulanz PHA induzierte in den Lymphozyten der  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine eine auffallend reduzierte Proliferation. Diese Ergebnisse gaben Hinweise darauf, dass die peripheren T-Zellen der  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine in der 12. Lebenswoche funktionell von den T-Zellen der Wildtypen abweichen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die peripheren  $CD4^+$  T-Zellen in der differentiellen Proteomanalyse verglichen. Insgesamt wurde so ein hochauflösendes porcines  $CD4$ -Proteom mit 2704 identifizierten Proteinen erstellt. Ein besonders interessanter Kandidat des Proteomik-Experiments war das Protein Annexin A1. Mit hoher statistischer Signifikanz wurde es zweifach differentiell abundant bei den  $CD4^+$  T-Zellen der  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweine identifiziert. Verifikationsversuche offenbarten einen erhöhten Anteil von Annexin A1 auf der Zelloberfläche diabetischer  $CD4^+$  T-Zellen, wohingegen sich intrazellulär exprimiertes Annexin A1 nicht zwischen den Phänotypen unterschied. Es ist noch fraglich, warum die diabetischen  $CD4^+$  T-Zellen dieses Protein verstärkt auf ihre Zelloberfläche translozierten. Ob Annexin A1 zur Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort beitragen könnte oder ob es möglicherweise als Kommunikationsprotein zwischen Immunzellen dient, muss nun im Weiteren untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen für eindeutige Abweichungen der metabolischen Funktion von PBMCs sowie veränderter Proteinexpressionsmuster peripherer  $CD4^+$  T-Zellen aus diabetischen  $INS^{C94Y}$  transgenen Schweinen. Das Ergebnis des selektiv differentiell exprimierten Annexin A1 besitzt aufgrund der komplexen Funktionalität des Proteins im immunologischen Kontext und mit Hinblick auf weitere Diabetesstudien, die dieses Protein mit einer diabetogenen Stoffwechsellage im Menschen assoziierten, großes Potential für weitere Untersuchungen und für die translationale Diabetes mellitus-Forschung.

## 7 SUMMARY

Diabetes mellitus, as well as its life-threatening complications, refer to one of the major health diseases with nearly half a billion people affected worldwide and a permanently increasing prevalence. Chronic hyperglycaemia is the main feature of diabetes mellitus, and significantly affects immunological functions and the immune status of patients. Undoubtedly, there is a link between the disease and an impaired immune system, but the molecular mechanisms involved in altered immune cell function in diabetic patients are still unknown to date.

Appropriate animal models are used to answer specific questions of translational diabetes mellitus research. While widely used rodent models have limitations displaying the human diabetic phenotype, the pig is a favourable diabetes model due to its close similarity to humans regarding anatomical, physiological and immunological aspects. Genetically engineered INS<sup>C94Y</sup> transgenic pigs were generated as a large animal model of permanent neonatal diabetes mellitus. Early on, these diabetic pigs are characterized by impaired insulin secretion with consecutive hypoinsulinaemia and increased fasting blood glucose levels. In order to characterize the immunological properties of this diabetes model, this study used peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of INS<sup>C94Y</sup> transgenic pigs and non-transgenic wild-type littermates to investigate differences in lymphocyte populations, metabolism and proliferative capacity at the age of 4, 8, and 12 weeks. Moreover, porcine CD4<sup>+</sup> T cells were examined to gain insights into their cellular metabolism, and to obtain an accurate protein profile of these cells at initial stage of disease.

In a first experiment, analysed lymphocyte populations by flow cytometry revealed no differences between phenotypes in all ages. As immune cell function and metabolism are intimately linked and changes in cell metabolism at both the cell and system levels have been shown to influence cellular function, the cellular metabolism of porcine PBMC was examined in the next step. Measuring cellular oxygen consumption rate and proton flux, PBMC of INS<sup>C94Y</sup> transgenic pigs demonstrated a significant increase in mitochondrial respiration and glycolytic capacity at the age of 12 weeks. To further evaluate functional disturbances at this time point, proliferative responses of porcine lymphocytes were investigated using different mitogens for cellular polyc stimulation. Insufficient lymphocyte proliferation was observed in diabetic pigs by PHA stimulation.

## Summary

---

These data indicated that T cell function may vary in INS<sup>C94Y</sup> transgenic pigs. To evaluate a key player in diabetes mellitus and its complications, CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed concerning metabolic function and protein profile. While cellular metabolism did not differ between CD4<sup>+</sup> T cells of both phenotypes, proteomic profiling resulted in 2704 identified proteins revealing a complex and whole-proteome of porcine CD4<sup>+</sup> T cells. Among these, Annexin A1 was recognized as a protein with highly significant differences in protein abundances and a 2-fold increase in INS<sup>C94Y</sup> transgenic pigs. Interestingly, verification experiments revealed a high amount of Annexin A1 on the cell surface of CD4<sup>+</sup> T cells in INS<sup>C94Y</sup> transgenic pigs, while intracellularly expressed Annexin A1 did not differ between the phenotypes. Whether annexin A1 could contribute to the induction of a pro-inflammatory immune response or whether it could possibly serve as a communication protein between immune cells must now be examined in more detail. Due to the protein's complex functionality in an immunological context and with regard to further studies on diabetes that associate this protein with a diabetogenic metabolism in humans, the result of Annexin A1 offers great potential for further research and translational diabetes mellitus research.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aigner, B., B. Rathkolb, N. Herbach, M. Hrabe de Angelis, R. Wanke, and E. Wolf. 2008. 'Diabetes models by screen for hyperglycemia in phenotype-driven ENU mouse mutagenesis projects', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294: E232-40.
- Aigner, B., S. Renner, B. Kessler, N. Klymiuk, M. Kurome, A. Wunsch, and E. Wolf. 2010. 'Transgenic pigs as models for translational biomedical research', *J Mol Med (Berl)*, 88: 653-64.
- Alfatni, A., M. Riou, A. L. Charles, A. Meyer, C. Barnig, E. Andres, A. Lejay, S. Talha, and B. Geny. 2020. 'Peripheral Blood Mononuclear Cells and Platelets Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Circulating mtDNA in Cardiovascular Diseases', *J Clin Med*, 9.
- Amirruddin, Nur Shabrina, Yaw Sing Tan, Chandra S. Verma, Daphne Gardner, Yong Mong Bee, Shawn Hoon, and Adrian Teo. 2019. '1784-P: Studying the Impact of Heterozygous Human INS Gene Mutation on Pancreatic  $\beta$  Cell', *Diabetes*, 68: 1784-P.
- Ando, Y., C. Yasuoka, T. Mishima, T. Ikematsu, T. Uede, T. Matsunaga, and M. Inobe. 2014. 'Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 50: 313-20.
- Anel, A., A. Gallego-Lleyda, D. de Miguel, J. Naval, and L. Martinez-Lostao. 2019. 'Role of Exosomes in the Regulation of T-cell Mediated Immune Responses and in Autoimmune Disease', *Cells*, 8.
- Antvorskov, J. C., T. I. Halldorsson, K. Josefsen, J. Svensson, C. Granstrom, B. O. Roep, T. H. Olesen, L. Hrolfsdottir, K. Buschard, and S. F. Olsen. 2018. 'Association between maternal gluten intake and type 1 diabetes in offspring: national prospective cohort study in Denmark', *Bmj*, 362: k3547.
- Association, A. D. 2020. '1. Improving Care and Promoting Health in Populations: Standards of Medical Care in Diabetes-2020', *Diabetes Care*, 43: S7-s13.
- Atkinson, M. A., B. O. Roep, A. Posgai, D. C. S. Wheeler, and M. Peakman. 2019. 'The challenge of modulating beta-cell autoimmunity in type 1 diabetes', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 7: 52-64.
- Avolio, E., P. Gualtieri, L. Romano, C. Pecorella, S. Ferraro, G. Palma, L. Di Renzo, and A. De Lorenzo. 2020. 'Obesity and Body Composition in Man and Woman: Associated Diseases and the New Role of Gut Microbiota', *Curr Med Chem*, 27: 216-29.
- Ayres, J. S. 2020. 'Immunometabolism of infections', *Nat Rev Immunol*, 20: 79-80.
- Backman, M., F. Flenkenthaler, A. Blutke, M. Dahlhoff, E. Landstrom, S. Renner, J. Philippou-Massier, S. Krebs, B. Rathkolb, C. Prehn, M. Grzybek, U. Coskun, M.

- Rothe, J. Adamski, M. H. de Angelis, R. Wanke, T. Frohlich, G. J. Arnold, H. Blum, and E. Wolf. 2019. 'Multi-omics insights into functional alterations of the liver in insulin-deficient diabetes mellitus', *Mol Metab*, 26: 30-44.
- Bajaj, G., Y. Zhang, M. I. Schimerlik, A. M. Hau, J. Yang, T. M. Filtz, C. Kioussi, and J. E. Ishmael. 2009. 'N-methyl-D-aspartate receptor subunits are non-myosin targets of myosin regulatory light chain', *J Biol Chem*, 284: 1252-66.
- Baker, R. L., B. L. Jamison, T. A. Wiles, R. S. Lindsay, G. Barbour, B. Bradley, T. Delong, R. S. Friedman, M. Nakayama, and K. Haskins. 2018. 'CD4 T Cells Reactive to Hybrid Insulin Peptides Are Indicators of Disease Activity in the NOD Mouse', *Diabetes*, 67: 1836-46.
- Barbot, M., F. Ceccato, and C. Scaroni. 2018. 'Diabetes Mellitus Secondary to Cushing's Disease', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9: 284.
- Bauer, T., W. Sipos, T. D. Stark, T. Kaser, C. Knecht, R. Brunthaler, A. Saalmuller, T. Hofmann, and M. Ehling-Schulz. 2018. 'First Insights Into Within Host Translocation of the Bacillus cereus Toxin Cereulide Using a Porcine Model', *Front Microbiol*, 9: 2652.
- Behrend, E., A. Holford, P. Lathan, R. Rucinsky, and R. Schulman. 2018. '2018 AAHA Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats', *J Am Anim Hosp Assoc*, 54: 1-21.
- Bekeredjian-Ding, I., S. Foermer, C. J. Kirschning, M. Parcina, and K. Heeg. 2012. 'Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes', *PLoS One*, 7: e29806.
- Bellamy, L., J. P. Casas, A. D. Hingorani, and D. Williams. 2009. 'Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis', *Lancet*, 373: 1773-9.
- Bens, S., R. Siebert, and A. Caliebe. 2010. 'Transienter neonataler Diabetes und Hypomethylierungssyndrome', *medizinische genetik*, 22: 411-18.
- Berge, Tone, Anna Eriksson, Ina Skaara Brorson, Einar August Høgestøl, Pål Berg-Hansen, Anne Døskeland, Olav Mjaavatten, Steffan Daniel Bos, Hanne F. Harbo, and Frode Berven. 2019. 'Quantitative proteomic analyses of CD4+ and CD8+ T cells reveal differentially expressed proteins in multiple sclerosis patients and healthy controls', *Clinical Proteomics*, 16: 19.
- Bettencourt, I. A., and J. D. Powell. 2017. 'Targeting Metabolism as a Novel Therapeutic Approach to Autoimmunity, Inflammation, and Transplantation', *J Immunol*, 198: 999-1005.
- Beyerlein, Andreas, Ruth Chmiel, Sandra Hummel, Christiane Winkler, Ezio Bonifacio, and Anette-Gabriele Ziegler. 2014. 'Timing of Gluten Introduction and Islet Autoimmunity in Young Children: Updated Results From the BABYDIET Study', 37: e194-e95.

- Bhattamisra, S. K., T. C. Siang, C. Y. Rong, N. C. Annan, E. H. Y. Sean, L. W. Xi, O. S. Lyn, L. H. Shan, H. Choudhury, M. Pandey, and B. Gorain. 2019. 'Type-3c Diabetes Mellitus, Diabetes of Exocrine Pancreas - An Update', *Curr Diabetes Rev*, 15: 382-94.
- Bishay, R. H., and J. R. Greenfield. 2016. 'A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY', *Med J Aust*, 205: 480-85.
- Bock, T., A. Kyhnel, B. Pakkenberg, and K. Buschard. 2003. 'The postnatal growth of the beta-cell mass in pigs', *J Endocrinol*, 179: 245-52.
- Bock, Troels, Bente Pakkenberg, and Karsten Buschard. 2005. 'Genetic Background Determines the Size and Structure of the Endocrine Pancreas', *Diabetes*, 54: 133-37.
- Bonifacio, E., A. Beyerlein, M. Hippich, C. Winkler, K. Vehik, M. N. Weedon, M. Laimighofer, A. T. Hattersley, J. Krumsiek, B. I. Frohnert, A. K. Steck, W. A. Hagopian, J. P. Krischer, A. Lernmark, M. J. Rewers, J. X. She, J. Toppari, B. Akolkar, R. A. Oram, S. S. Rich, and A. G. Ziegler. 2018. 'Genetic scores to stratify risk of developing multiple islet autoantibodies and type 1 diabetes: A prospective study in children', *PLoS Med*, 15: e1002548.
- Bonifacio, E., A. G. Ziegler, G. Klingensmith, E. Schober, P. J. Bingley, M. Rottenkolber, A. Theil, A. Eugster, R. Puff, C. Peplow, F. Buettner, K. Lange, J. Hasford, and P. Achenbach. 2015. 'Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: the Pre-POINT randomized clinical trial', *Jama*, 313: 1541-9.
- Boudhraa, Z., B. Bouchon, C. Viallard, M. D'Incan, and F. Degoul. 2016. 'Annexin A1 localization and its relevance to cancer', *Clin Sci (Lond)*, 130: 205-20.
- Boudoures, A. L., J. Saben, A. Drury, S. Scheaffer, Z. Modi, W. Zhang, and K. H. Moley. 2017. 'Obesity-exposed oocytes accumulate and transmit damaged mitochondria due to an inability to activate mitophagy', *Dev Biol*, 426: 126-38.
- Bruschi, M., A. Petretto, A. Vaglio, L. Santucci, G. Candiano, and G. M. Ghiggeri. 2018. 'Annexin A1 and Autoimmunity: From Basic Science to Clinical Applications', *Int J Mol Sci*, 19.
- Buck, M. D., D. O'Sullivan, R. I. Klein Geltink, J. D. Curtis, C. H. Chang, D. E. Sanin, J. Qiu, O. Kretz, D. Braas, G. J. van der Windt, Q. Chen, S. C. Huang, C. M. O'Neill, B. T. Edelson, E. J. Pearce, H. Sesaki, T. B. Huber, A. S. Rambold, and E. L. Pearce. 2016. 'Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming', *Cell*, 166: 63-76.
- Buck, M. D., R. T. Sowell, S. M. Kaech, and E. L. Pearce. 2017. 'Metabolic Instruction of Immunity', *Cell*, 169: 570-86.

- Burrack, A. L., T. Martinov, and B. T. Fife. 2017. 'T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8: 343.
- Calderon, B., A. Suri, X. O. Pan, J. C. Mills, and E. R. Unanue. 2008. 'IFN-gamma-dependent regulatory circuits in immune inflammation highlighted in diabetes', *J Immunol*, 181: 6964-74.
- Carvalho, Evmm, W. F. Oliveira, Lcbb Coelho, and M. T. S. Correia. 2018. 'Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed', *Life Sci*, 207: 152-57.
- Catchpole, B., J. P. Adams, A. L. Holder, A. D. Short, W. E. Ollier, and L. J. Kennedy. 2013. 'Genetics of canine diabetes mellitus: are the diabetes susceptibility genes identified in humans involved in breed susceptibility to diabetes mellitus in dogs?', *Vet J*, 195: 139-47.
- Cattaneo, F., M. Parisi, and R. Ammendola. 2013. 'Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists', *Int J Mol Sci*, 14: 7193-230.
- Cefalu, W. T. 2006. 'Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition', *ILAR J*, 47: 186-98.
- Chang, C. H., J. Qiu, D. O'Sullivan, M. D. Buck, T. Noguchi, J. D. Curtis, Q. Chen, M. Gindin, M. M. Gubin, G. J. van der Windt, E. Tonc, R. D. Schreiber, E. J. Pearce, and E. L. Pearce. 2015. 'Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression', *Cell*, 162: 1229-41.
- Chang, F. Y., and M. F. Shaio. 1995. 'Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus', *Diabetes Res Clin Pract*, 28: 137-46.
- Chen, J., A. V. Chernatynskaya, J. W. Li, M. R. Kimbrell, R. J. Cassidy, D. J. Perry, A. B. Muir, M. A. Atkinson, T. M. Brusko, and C. E. Mathews. 2017. 'T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes', *Sci Rep*, 7: 10835.
- Chow, E. Y. K., and J. C. N. Chan. 2020. 'Insulin resistance versus beta-cell dysfunction in type 2 diabetes: where public and personalised health meet', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8: 92-93.
- Corbin, K. D., K. A. Driscoll, R. E. Pratley, S. R. Smith, D. M. Maahs, and E. J. Mayer-Davis. 2018. 'Obesity in Type 1 Diabetes: Pathophysiology, Clinical Impact, and Mechanisms', *Endocr Rev*, 39: 629-63.
- Cortez-Espinosa, N., J. D. Cortes-Garcia, E. Martinez-Leija, J. G. Rodriguez-Rivera, C. Barajas-Lopez, R. Gonzalez-Amaro, and D. P. Portales-Perez. 2015. 'CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes', *Hum Immunol*, 76: 622-30.
- Crotty, S. 2011. 'Follicular helper CD4 T cells (TFH)', *Annu Rev Immunol*, 29: 621-63.

- Czajka, A., S. Ajaz, L. Gnudi, C. K. Parsade, P. Jones, F. Reid, and A. N. Malik. 2015. 'Altered Mitochondrial Function, Mitochondrial DNA and Reduced Metabolic Flexibility in Patients With Diabetic Nephropathy', *EBioMedicine*, 2: 499-512.
- Czech, M. P. 2017. 'Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes', *Nat Med*, 23: 804-14.
- D'Acquisto, F., A. Merghani, E. Lecona, G. Rosignoli, K. Raza, C. D. Buckley, R. J. Flower, and M. Perretti. 2007. 'Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation', *Blood*, 109: 1095-102.
- D'Acquisto, F., N. Paschalidis, A. L. Sampaio, A. Merghani, R. J. Flower, and M. Perretti. 2007. 'Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells', *Eur J Immunol*, 37: 3131-42.
- D'Acunto, C. W., H. Gbelcova, M. Festa, and T. Ruml. 2014. 'The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation', *Cell Signal*, 26: 173-8.
- Davison, L. J., M. E. Herrtage, and B. Catchpole. 2011. 'Autoantibodies to recombinant canine proinsulin in canine diabetic patients', *Res Vet Sci*, 91: 58-63.
- Dayan, C. M., M. Korah, D. Tatovic, B. N. Bundy, and K. C. Herold. 2019. 'Changing the landscape for type 1 diabetes: the first step to prevention', *Lancet*, 394: 1286-96.
- de Laat, M. A., B. A. Hampson, M. N. Sillence, and C. C. Pollitt. 2016. 'Sustained, Low-Intensity Exercise Achieved by a Dynamic Feeding System Decreases Body Fat in Ponies', *J Vet Intern Med*, 30: 1732-38.
- de Laat, M. A., J. M. McGree, and M. N. Sillence. 2016. 'Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 310: E61-72.
- Despres, J. P., and I. Lemieux. 2006. 'Abdominal obesity and metabolic syndrome', *Nature*, 444: 881-7.
- Di Dedda, C., D. Vignali, L. Piemonti, and P. Monti. 2019. 'Pharmacological Targeting of GLUT1 to Control Autoreactive T Cell Responses', *Int J Mol Sci*, 20.
- DiMeglio, L. A., C. Evans-Molina, and R. A. Oram. 2018. 'Type 1 diabetes', *Lancet*, 391: 2449-62.
- Divakaruni, A. S., A. Paradyse, D. A. Ferrick, A. N. Murphy, and M. Jastroch. 2014. 'Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data', *Methods Enzymol*, 547: 309-54.
- Doerrier, C., L. F. Garcia-Souza, G. Krumschnabel, Y. Wohlfarter, A. T. Meszaros, and E. Gnaiger. 2018. 'High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria', *Methods Mol Biol*, 1782: 31-70.

- Doherty, M. L., A. M. Healy, and W. J. Donnelly. 1998. 'Diabetes mellitus associated with lymphocytic pancreatitis in a cow', *Vet Rec*, 142: 493.
- Domblides, C., L. Lartigue, and B. Faustin. 2018. 'Metabolic Stress in the Immune Function of T Cells, Macrophages and Dendritic Cells', *Cells*, 7.
- Donath, M. Y., C. A. Dinarello, and T. Mandrup-Poulsen. 2019. 'Targeting innate immune mediators in type 1 and type 2 diabetes', *Nat Rev Immunol*, 19: 734-46.
- Donnelly, R. P., and D. K. Finlay. 2015. 'Glucose, glycolysis and lymphocyte responses', *Mol Immunol*, 68: 513-9.
- DuPage, M., and J. A. Bluestone. 2016. 'Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease', *Nat Rev Immunol*, 16: 149-63.
- Durham, A. E., N. Frank, C. M. McGowan, N. J. Menzies-Gow, E. Roelfsema, I. Vervuert, K. Feige, and K. Fey. 2019. 'ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome', *J Vet Intern Med*, 33: 335-49.
- Ebner, F., S. Rausch, L. Scharek-Tedin, R. Pieper, M. Burwinkel, J. Zentek, and S. Hartmann. 2014. 'A novel lineage transcription factor based analysis reveals differences in T helper cell subpopulation development in infected and intrauterine growth restricted (IUGR) piglets', *Dev Comp Immunol*, 46: 333-40.
- Faldyna, M., P. Samankova, L. Leva, J. Cerny, J. Oujezdska, Z. Rehakova, and J. Sinkora. 2007. 'Cross-reactive anti-human monoclonal antibodies as a tool for B-cell identification in dogs and pigs', *Vet Immunol Immunopathol*, 119: 56-62.
- Fallahi, P., S. M. Ferrari, I. Ruffilli, G. Elia, M. Biricotti, R. Vita, S. Benvenga, and A. Antonelli. 2016. 'The association of other autoimmune diseases in patients with autoimmune thyroiditis: Review of the literature and report of a large series of patients', *Autoimmun Rev*, 15: 1125-28.
- Fang, J. Y., C. H. Lin, T. H. Huang, and S. Y. Chuang. 2019. 'In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity', *Nutrients*, 11.
- Feingold, K. R. 2000. 'Atypical Forms of Diabetes.' in K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trence, A. Vinik and D. P. Wilson (eds.), *Endotext* (MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA)).
- Ferreira, S. S., M. A. Oliveira, M. Tsujita, F. P. B. Nunes, F. B. Casagrande, E. Gomes, M. Russo, W. Tavares de Lima, and J. O. Martins. 2020. 'Insulin Modulates the Immune Cell Phenotype in Pulmonary Allergic Inflammation and Increases Pulmonary Resistance in Diabetic Mice', *Front Immunol*, 11: 84.

- Fetterman, J. L., M. Holbrook, D. G. Westbrook, J. A. Brown, K. P. Feeley, R. Breton-Romero, E. A. Linder, B. D. Berk, R. M. Weisbrod, M. E. Widlansky, N. Gokce, S. W. Ballinger, and N. M. Hamburg. 2016. 'Mitochondrial DNA damage and vascular function in patients with diabetes mellitus and atherosclerotic cardiovascular disease', *Cardiovasc Diabetol*, 15: 53.
- Fischer, Henrike J., Christopher Sie, Eric Schumann, Ann-Kathrin Witte, Ralf Dressel, Jens van den Brandt, and Holger M. Reichardt. 2017. 'The Insulin Receptor Plays a Critical Role in T Cell Function and Adaptive Immunity', *The Journal of Immunology*, 198: 1910-20.
- Fischer, M., G. R. Bantug, S. Dimeloe, P. M. Gubser, A. V. Burgener, J. Grahlert, M. L. Balmer, L. Develioglu, R. Steiner, G. Unterstab, U. Sauder, G. Hoenger, and C. Hess. 2018. 'Early effector maturation of naive human CD8(+) T cells requires mitochondrial biogenesis', *Eur J Immunol*, 48: 1632-43.
- Fisher, S. J., Z. Q. Shi, H. L. Lickley, S. Efendic, M. Vranic, and A. Giacca. 2001. 'Low-dose IGF-I has no selective advantage over insulin in regulating glucose metabolism in hyperglycemic depancreatized dogs', *J Endocrinol*, 168: 49-58.
- Fonouni, H., M. Tahmasbi Rad, M. Esmaeilzadeh, M. Golriz, A. Majlesara, and A. Mehrabi. 2015. 'A simplified technique of pancreas transplantation in a porcine model', *Eur Surg Res*, 54: 24-33.
- Francisco, C. O., A. M. Catai, S. C. Moura-Tonello, L. C. Arruda, S. L. Lopes, B. G. Benze, A. M. Del Vale, K. C. Malmegrim, and A. M. Leal. 2016. 'Cytokine profile and lymphocyte subsets in type 2 diabetes', *Braz J Med Biol Res*, 49: e5062.
- Frydrych, L. M., G. Bian, D. E. O'Lone, P. A. Ward, and M. J. Delano. 2018. 'Obesity and type 2 diabetes mellitus drive immune dysfunction, infection development, and sepsis mortality', *J Leukoc Biol*, 104: 525-34.
- Funes, S. C., A. Manrique de Lara, M. J. Altamirano-Lagos, J. P. Mackern-Oberti, J. Escobar-Vera, and A. M. Kalergis. 2019. 'Immune checkpoints and the regulation of tolerogenicity in dendritic cells: Implications for autoimmunity and immunotherapy', *Autoimmun Rev*, 18: 359-68.
- Furman, D., J. Campisi, E. Verdin, P. Carrera-Bastos, S. Targ, C. Franceschi, L. Ferrucci, D. W. Gilroy, A. Fasano, G. W. Miller, A. H. Miller, A. Mantovani, C. M. Weyand, N. Barzilai, J. J. Goronzy, T. A. Rando, R. B. Effros, A. Lucia, N. Kleinstreuer, and G. M. Slavich. 2019. 'Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span', *Nat Med*, 25: 1822-32.
- Gaal, Z., and I. Balogh. 2019. 'Monogenic Forms of Diabetes Mellitus', *Exp Suppl*, 111: 385-416.
- Gaber, T., Y. Chen, P. L. Krauss, and F. Buttgerit. 2019. 'Metabolism of T Lymphocytes in Health and Disease', *Int Rev Cell Mol Biol*, 342: 95-148.

- Gaber, T., C. Strehl, B. Sawitzki, P. Hoff, and F. Buttgereit. 2015. 'Cellular energy metabolism in T-lymphocytes', *Int Rev Immunol*, 34: 34-49.
- Gao, Y., Y. Wang, X. Zhai, Y. He, R. Chen, J. Zhou, M. Li, and Q. Wang. 2017. 'Publication trends of research on diabetes mellitus and T cells (1997-2016): A 20-year bibliometric study', *PLoS One*, 12: e0184869.
- Geltink, R. I. K., R. L. Kyle, and E. L. Pearce. 2018. 'Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function', *Annu Rev Immunol*, 36: 461-88.
- Gerner, W., T. Kaser, and A. Saalmuller. 2009. 'Porcine T lymphocytes and NK cells-an update', *Dev Comp Immunol*, 33: 310-20.
- Gerner, W., S. C. Talker, H. C. Koinig, C. Sedlak, K. H. Mair, and A. Saalmuller. 2015. 'Phenotypic and functional differentiation of porcine alphabeta T cells: current knowledge and available tools', *Mol Immunol*, 66: 3-13.
- Gilor, C., S. J. Niessen, E. Furrow, and S. P. DiBartola. 2016. 'What's in a Name? Classification of Diabetes Mellitus in Veterinary Medicine and Why It Matters', *J Vet Intern Med*, 30: 927-40.
- Gnanaprakasam, J. N. R., J. W. Sherman, and R. Wang. 2017. 'MYC and HIF in shaping immune response and immune metabolism', *Cytokine Growth Factor Rev*, 35: 63-70.
- Gole, E., S. Oikonomou, S. Ellard, E. De Franco, and K. Karavanaki. 2018. 'A Novel KCNJ11 Mutation Associated with Transient Neonatal Diabetes', *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 10: 175-78.
- Greeley, S. A. W., L. R. Letourneau, and L. H. Philipson. 2018. 'Precision medicine in KCNJ11 permanent neonatal diabetes', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 6: 594-95.
- Gregorich, Z. R., W. Cai, Z. Lin, A. J. Chen, Y. Peng, T. Kohmoto, and Y. Ge. 2017. 'Distinct sequences and post-translational modifications in cardiac atrial and ventricular myosin light chains revealed by top-down mass spectrometry', *J Mol Cell Cardiol*, 107: 13-21.
- Groele, L., H. Szajewska, and A. Szybowska. 2017. 'Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium lactis* Bb12 on beta-cell function in children with newly diagnosed type 1 diabetes: protocol of a randomised controlled trial', *BMJ Open*, 7: e017178.
- Grohova, A., K. Danova, R. Spisek, and L. Palova-Jelinkova. 2019. 'Cell Based Therapy for Type 1 Diabetes: Should We Take Hyperglycemia Into Account?', *Front Immunol*, 10: 79.
- Guilherme, A., J. V. Virbasius, V. Puri, and M. P. Czech. 2008. 'Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 367-77.

- Guo, H., J. B. Callaway, and J. P. Ting. 2015. 'Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics', *Nat Med*, 21: 677-87.
- Haas, J. T., and S. B. Biddinger. 2009. 'Dissecting the role of insulin resistance in the metabolic syndrome', *Curr Opin Lipidol*, 20: 206-10.
- Hao, W., H. T. Bahnson, C. Speake, K. Cerosaletti, and C. J. Greenbaum. 2020. 'In-vivo assessment of T cell kinetics in individuals at risk for type 1 diabetes', *Clin Exp Immunol*, 199: 50-55.
- Harding, J. L., M. E. Pavkov, D. J. Magliano, J. E. Shaw, and E. W. Gregg. 2019. 'Global trends in diabetes complications: a review of current evidence', *Diabetologia*, 62: 3-16.
- Hartman, M. L., O. S. Shirihai, M. Holbrook, G. Xu, M. Kocherla, A. Shah, J. L. Fetterman, M. A. Kluge, A. A. Frame, N. M. Hamburg, and J. A. Vita. 2014. 'Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus', *Vasc Med*, 19: 67-74.
- Hay, M., D. W. Thomas, J. L. Craighead, C. Economides, and J. Rosenthal. 2014. 'Clinical development success rates for investigational drugs', *Nat Biotechnol*, 32: 40-51.
- He, S., Y. Chen, L. Wei, X. Jin, L. Zeng, Y. Ren, J. Zhang, L. Wang, H. Li, Y. Lu, and J. Cheng. 2011. 'Treatment and risk factor analysis of hypoglycemia in diabetic rhesus monkeys', *Exp Biol Med (Maywood)*, 236: 212-8.
- Heissler, Sarah M., and James R. Sellers. 2014. 'Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks', *Bioarchitecture*, 4: 169-88.
- Henson, M. S., and T. D. O'Brien. 2006. 'Feline models of type 2 diabetes mellitus', *ILAR J*, 47: 234-42.
- Herold, K. C., B. N. Bundy, S. A. Long, J. A. Bluestone, L. A. DiMeglio, M. J. Dufort, S. E. Gitelman, P. A. Gottlieb, J. P. Krischer, P. S. Linsley, J. B. Marks, W. Moore, A. Moran, H. Rodriguez, W. E. Russell, D. Schatz, J. S. Skyler, E. Tsalikian, D. K. Wherrett, A. G. Ziegler, and C. J. Greenbaum. 2019. 'An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes', *N Engl J Med*, 381: 603-13.
- Hinkel, R., A. Howe, S. Renner, J. Ng, S. Lee, K. Klett, V. Kaczmarek, A. Moretti, K. L. Laugwitz, P. Skroblin, M. Mayr, H. Milting, A. Dendorfer, B. Reichart, E. Wolf, and C. Kupatt. 2017. 'Diabetes Mellitus-Induced Microvascular Destabilization in the Myocardium', *J Am Coll Cardiol*, 69: 131-43.
- Hombach, J., T. Tsubata, L. Leclercq, H. Stappert, and M. Reth. 1990. 'Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class', *Nature*, 343: 760-2.

- Hoogwerf, B. J. 2020. 'Type of diabetes mellitus: Does it matter to the clinician?', *Cleve Clin J Med*, 87: 100-08.
- Hosseininasab Nodoushan, S. A., and A. Nabavi. 2019. 'The Interaction of Helicobacter pylori Infection and Type 2 Diabetes Mellitus', *Adv Biomed Res*, 8: 15.
- Howden, A. J. M., J. L. Hukelmann, A. Brenes, L. Spinelli, L. V. Sinclair, A. I. Lamond, and D. A. Cantrell. 2019. 'Quantitative analysis of T cell proteomes and environmental sensors during T cell differentiation', *Nat Immunol*, 20: 1542-54.
- Hu, R., C. Q. Xia, E. Butfiloski, and M. Clare-Salzler. 2018. 'Effect of high glucose on cytokine production by human peripheral blood immune cells and type I interferon signaling in monocytes: Implications for the role of hyperglycemia in the diabetes inflammatory process and host defense against infection', *Clin Immunol*, 195: 139-48.
- Hu, S., C. W. Chen, S. T. Chen, K. H. Tsui, T. K. Tang, H. T. Cheng, G. S. Hwang, J. W. Yu, Y. C. Li, P. S. Wang, and S. W. Wang. 2019. 'Inhibitory effect of berberine on interleukin-2 secretion from PHA-treated lymphocytic Jurkat cells', *Int Immunopharmacol*, 66: 267-73.
- Huang, P., Y. Zhou, Z. Liu, and P. Zhang. 2016. 'Interaction between ANXA1 and GATA-3 in Immunosuppression of CD4(+) T Cells', *Mediators Inflamm*, 2016: 1701059.
- Huang-Doran, I., C. Y. Zhang, and A. Vidal-Puig. 2017. 'Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease', *Trends Endocrinol Metab*, 28: 3-18.
- Ilonen, J., J. Lempainen, and R. Veijola. 2019. 'The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus', *Nat Rev Endocrinol*, 15: 635-50.
- Ionut, V., H. Liu, V. Mooradian, A. V. Castro, M. Kabir, D. Stefanovski, D. Zheng, E. L. Kirkman, and R. N. Bergman. 2010. 'Novel canine models of obese prediabetes and mild type 2 diabetes', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: E38-48.
- Jacobi, T., L. Massier, N. Kloting, K. Horn, A. Schuch, P. Ahnert, C. Engel, M. Loffler, R. Burkhardt, J. Thiery, A. Tonjes, M. Stumvoll, M. Bluher, I. Doxiadis, M. Scholz, and P. Kovacs. 2020. 'HLA class II allele analyses implicate common genetic components in type 1 and non-insulin treated type 2 diabetes', *J Clin Endocrinol Metab*.
- Jaganathan, R., R. Ravindran, and S. Dhanasekaran. 2018. 'Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and Cardiovascular Disease', *Can J Diabetes*, 42: 446-56.e1.
- Jones, M., J. L. Cordell, A. D. Beyers, A. G. Tse, and D. Y. Mason. 1993. 'Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies', *J Immunol*, 150: 5429-35.

- Kakleas, K., A. Soldatou, F. Karachaliou, and K. Karavanaki. 2015. 'Associated autoimmune diseases in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM)', *Autoimmun Rev*, 14: 781-97.
- Kane, H., and L. Lynch. 2019. 'Innate Immune Control of Adipose Tissue Homeostasis', *Trends Immunol*, 40: 857-72.
- Karikoski, N. P., I. Horn, T. W. McGowan, and C. M. McGowan. 2011. 'The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital', *Domest Anim Endocrinol*, 41: 111-7.
- Käser, T., K. H. Mair, S. E. Hammer, W. Gerner, and A. Saalmuller. 2015. 'Natural and inducible Tregs in swine: Helios expression and functional properties', *Dev Comp Immunol*, 49: 323-31.
- Kauffman, M. E., M. K. Kauffman, K. Traore, H. Zhu, M. A. Trush, Z. Jia, and Y. R. Li. 2016. 'MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS', *React Oxyg Species (Apex)*, 2: 361-70.
- Kavvoura, Fotini K., and Katharine R. Owen. 2019. 'Monogenic diabetes', *Medicine*, 47: 16-21.
- Kenefeck, R., C. J. Wang, T. Kapadi, L. Wardzinski, K. Attridge, L. E. Clough, F. Heuts, A. Kogimtzis, S. Patel, M. Rosenthal, M. Ono, D. M. Sansom, P. Narendran, and L. S. Walker. 2015. 'Follicular helper T cell signature in type 1 diabetes', *J Clin Invest*, 125: 292-303.
- Kim, J. H., K. Park, S. B. Lee, S. Kang, J. S. Park, C. W. Ahn, and J. S. Nam. 2019. 'Relationship between natural killer cell activity and glucose control in patients with type 2 diabetes and prediabetes', *J Diabetes Investig*, 10: 1223-28.
- King, A. J. 2012. 'The use of animal models in diabetes research', *Br J Pharmacol*, 166: 877-94.
- Kleinert, M., C. Clemmensen, S. M. Hofmann, M. C. Moore, S. Renner, S. C. Woods, P. Huypens, J. Beckers, M. H. de Angelis, A. Schurmann, M. Bakhti, M. Klingenspor, M. Heiman, A. D. Cherrington, M. Ristow, H. Lickert, E. Wolf, P. J. Havel, T. D. Muller, and M. H. Tschop. 2018. 'Animal models of obesity and diabetes mellitus', *Nat Rev Endocrinol*, 14: 140-62.
- Kleinwort, K. J. H., B. Amann, S. M. Hauck, S. Hirmer, A. Blutke, S. Renner, P. B. Uhl, K. Lutterberg, W. Sekundo, E. Wolf, and C. A. Deeg. 2017. 'Retinopathy with central oedema in an INS (C94Y) transgenic pig model of long-term diabetes', *Diabetologia*, 60: 1541-49.
- Knoop, J., A. Eugster, A. Gavrisan, R. Lickert, E. M. Sedlmeier, S. Dietz, A. Lindner, K. Warncke, N. Hummel, A. G. Ziegler, and E. Bonifacio. 2020. 'Maternal Type 1 Diabetes Reduces Autoantigen-Responsive CD4(+) T Cells in Offspring', *Diabetes*.

- Koppaka, S., S. Kehlenbrink, M. Carey, W. Li, E. Sanchez, D. E. Lee, H. Lee, J. Chen, E. Carrasco, P. Kishore, K. Zhang, and M. Hawkins. 2013. 'Reduced adipose tissue macrophage content is associated with improved insulin sensitivity in thiazolidinedione-treated diabetic humans', *Diabetes*, 62: 1843-54.
- Kramer, P. A., S. Ravi, B. Chacko, M. S. Johnson, and V. M. Darley-Usmar. 2014. 'A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers', *Redox Biol*, 2: 206-10.
- Krummel, M. F., R. S. Friedman, and J. Jacobelli. 2014. 'Modes and mechanisms of T cell motility: roles for confinement and Myosin-IIA', *Curr Opin Cell Biol*, 30: 9-16.
- Kumar, N. P., K. Moideen, P. J. George, C. Dolla, P. Kumaran, and S. Babu. 2016. 'Coincident diabetes mellitus modulates Th1-, Th2-, and Th17-cell responses in latent tuberculosis in an IL-10- and TGF-beta-dependent manner', *Eur J Immunol*, 46: 390-9.
- Kumar, P., K. Natarajan, and N. Shanmugam. 2014. 'High glucose driven expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine genes in lymphocytes: molecular mechanisms of IL-17 family gene expression', *Cell Signal*, 26: 528-39.
- Kummer, S., C. Reinauer, and T. Meissner. 2015. 'Monogener Diabetes', *Der Diabetologe*, 11: 69-83.
- Lauder, I., J. Abascal, R. A. Cartwright, J. R. Farndon, and I. D. Johnston. 1981. 'Liver tumours following streptozotocin administration in rats and the effects of pancreatic islet cell transplantation', *Carcinogenesis*, 2: 799-803.
- Laurent, D., L. Vinet, S. Lamprianou, M. Daval, G. Filhoulaud, A. Ktorza, H. Wang, S. Sewing, H. P. Juretschke, H. Glombik, P. Meda, R. Boisgard, D. L. Nguyen, G. J. Stasiuk, N. J. Long, X. Montet, P. Hecht, W. Kramer, G. A. Rutter, and J. Hecksher-Sorensen. 2016. 'Pancreatic beta-cell imaging in humans: fiction or option?', *Diabetes Obes Metab*, 18: 6-15.
- Lee, L., M. Alloosh, R. Saxena, W. Van Alstine, B. A. Watkins, J. E. Klaunig, M. Sturek, and N. Chalasani. 2009. 'Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine', *Hepatology*, 50: 56-67.
- Leiter, E. H. 2001. 'The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus', *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15: Unit 15.9.
- Lemelman, M. B., L. Letourneau, and S. A. W. Greeley. 2018. 'Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management', *Clin Perinatol*, 45: 41-59.
- Lenzen, S. 2008. 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', *Diabetologia*, 51: 216-26.

- Lepper, M. F., U. Ohmayer, C. von Toerne, N. Maison, A. G. Ziegler, and S. M. Hauck. 2018. 'Proteomic Landscape of Patient-Derived CD4+ T Cells in Recent-Onset Type 1 Diabetes', *J Proteome Res*, 17: 618-34.
- Leslie, R. D., J. Palmer, N. C. Schloot, and A. Lernmark. 2016. 'Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment', *Diabetologia*, 59: 13-20.
- Lin, V. H., J. J. Chen, C. C. Liao, S. S. Lee, and E. J. Chien. 2016. 'The rapid immunosuppression in phytohemagglutinin-activated human T cells is inhibited by the proliferative Ca(2+) influx induced by progesterone and analogs', *Steroids*, 111: 71-78.
- Liu, M. H., Y. Li, L. Han, Y. Y. Zhang, D. Wang, Z. H. Wang, H. M. Zhou, M. Song, Y. H. Li, M. X. Tang, W. Zhang, and M. Zhong. 2017. 'Adipose-derived stem cells were impaired in restricting CD4(+)T cell proliferation and polarization in type 2 diabetic ApoE(-/-) mouse', *Mol Immunol*, 87: 152-60.
- Liu, M., L. Haataja, J. Wright, N. P. Wickramasinghe, Q. X. Hua, N. F. Phillips, F. Barbetti, M. A. Weiss, and P. Arvan. 2010. 'Mutant INS-gene induced diabetes of youth: proinsulin cysteine residues impose dominant-negative inhibition on wild-type proinsulin transport', *PLoS One*, 5: e13333.
- Liu, M., I. Hodish, L. Haataja, R. Lara-Lemus, G. Rajpal, J. Wright, and P. Arvan. 2010. 'Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth', *Trends Endocrinol Metab*, 21: 652-9.
- Liu, M., J. Sun, J. Cui, W. Chen, H. Guo, F. Barbetti, and P. Arvan. 2015. 'INS-gene mutations: from genetics and beta cell biology to clinical disease', *Mol Aspects Med*, 42: 3-18.
- Liu, M., M. A. Weiss, A. Arunagiri, J. Yong, N. Rege, J. Sun, L. Haataja, R. J. Kaufman, and P. Arvan. 2018. 'Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein', *Diabetes Obes Metab*, 20 Suppl 2: 28-50.
- Liu, M. Z., H. Y. He, J. Q. Luo, F. Z. He, Z. R. Chen, Y. P. Liu, D. X. Xiang, H. H. Zhou, and W. Zhang. 2018. 'Drug-induced hyperglycaemia and diabetes: pharmacogenomics perspectives', *Arch Pharm Res*, 41: 725-36.
- Luck, H., S. Tsai, J. Chung, X. Clemente-Casares, M. Ghazarian, X. S. Revelo, H. Lei, C. T. Luk, S. Y. Shi, A. Surendra, J. K. Copeland, J. Ahn, D. Prescott, B. A. Rasmussen, M. H. Chng, E. G. Engleman, S. E. Girardin, T. K. Lam, K. Croitoru, S. Dunn, D. J. Philpott, D. S. Guttman, M. Woo, S. Winer, and D. A. Winer. 2015. 'Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents', *Cell Metab*, 21: 527-42.
- Ludwig, B., S. Ludwig, A. Steffen, Y. Knauf, B. Zimerman, S. Heinke, S. Lehmann, U. Schubert, J. Schmid, M. Bleyer, U. Schonmann, C. K. Colton, E. Bonifacio, M. Solimena, A. Reichel, A. V. Schally, A. Rotem, U. Barkai, H. Grinberg-Rashi, F. J. Kaup, Y. Avni, P. Jones, and S. R. Bornstein. 2017. 'Favorable outcome of

- experimental islet xenotransplantation without immunosuppression in a nonhuman primate model of diabetes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 11745-50.
- Lund-Blix, N. A., F. Dong, K. Marild, J. Seifert, A. E. Baron, K. C. Waugh, G. Joner, K. Stordal, G. Tapia, L. C. Stene, R. K. Johnson, M. J. Rewers, and J. M. Norris. 2019. 'Gluten Intake and Risk of Islet Autoimmunity and Progression to Type 1 Diabetes in Children at Increased Risk of the Disease: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)', *Diabetes Care*, 42: 789-96.
- Lunney, J. K., K. Walker, T. Goldman, B. Aasted, A. Bianchi, R. Binns, S. Licence, R. Bischof, M. Brandon, F. Blecha, and et al. 1994. 'Overview of the First International Workshop to Define Swine Leukocyte Cluster of Differentiation (CD) Antigens', *Vet Immunol Immunopathol*, 43: 193-206.
- Lutterberg, K., K. J. H. Kleinwort, B. F. Hobmaier, S. M. Hauck, S. Nuske, A. M. Scholz, and C. A. Deeg. 2018. 'A Functionally Different Immune Phenotype in Cattle Is Associated With Higher Mastitis Incidence', *Front Immunol*, 9: 2884.
- Macintyre, A. N., V. A. Gerriets, A. G. Nichols, R. D. Michalek, M. C. Rudolph, D. Deoliveira, S. M. Anderson, E. D. Abel, B. J. Chen, L. P. Hale, and J. C. Rathmell. 2014. 'The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function', *Cell Metab*, 20: 61-72.
- MacIver, N. J., R. D. Michalek, and J. C. Rathmell. 2013. 'Metabolic regulation of T lymphocytes', *Annu Rev Immunol*, 31: 259-83.
- Mak, T. W., M. Grusdat, G. S. Duncan, C. Dostert, Y. Nonnenmacher, M. Cox, C. Binsfeld, Z. Hao, A. Brustle, M. Itsumi, C. Jager, Y. Chen, O. Pinkenburg, B. Camara, M. Ollert, C. Bindslev-Jensen, V. Vasiliou, C. Gorrini, P. A. Lang, M. Lohoff, I. S. Harris, K. Hiller, and D. Brenner. 2017. 'Glutathione Primes T Cell Metabolism for Inflammation', *Immunity*, 46: 675-89.
- Marchingo, J. M., L. V. Sinclair, A. J. Howden, and D. A. Cantrell. 2020. 'Quantitative analysis of how Myc controls T cell proteomes and metabolic pathways during T cell activation', *Elife*, 9.
- Mariuzza, R. A., P. Agnihotri, and J. Orban. 2019. 'The structural basis of T cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma', *J Biol Chem*.
- Marrocco, I., F. Altieri, and I. Peluso. 2017. 'Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans', *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 6501046.
- McLaughlin, T., S. E. Ackerman, L. Shen, and E. Engleman. 2017. 'Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease', *J Clin Invest*, 127: 5-13.
- McLaughlin, T., L. F. Liu, C. Lamendola, L. Shen, J. Morton, H. Rivas, D. Winer, L. Tolentino, O. Choi, H. Zhang, M. Hui Yen Chng, and E. Engleman. 2014. 'T-cell

- profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 2637-43.
- Menzies-Gow, N. J., P. A. Harris, and J. Elliott. 2017. 'Prospective cohort study evaluating risk factors for the development of pasture-associated laminitis in the United Kingdom', *Equine Vet J*, 49: 300-06.
- Monaco, G., B. Lee, W. Xu, S. Mustafah, Y. Y. Hwang, C. Carre, N. Burdin, L. Visan, M. Ceccarelli, M. Poidinger, A. Zippelius, J. Pedro de Magalhaes, and A. Larbi. 2019. 'RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types', *Cell Rep*, 26: 1627-40.e7.
- Montanya, E, V Nacher, M Biarnés, and J Soler. 2000. 'Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy', *Diabetes*, 49: 1341-46.
- Morel, P., D. B. Kaufmann, A. J. Matas, P. Tzardis, M. J. Field, J. K. Lloveras, and D. E. Sutherland. 1991. 'Total pancreatectomy in the pig for islet transplantation. Technical alternatives', *Transplantation*, 52: 11-5.
- Morgan, E., S. R. Halliday, G. R. Campbell, C. R. Cardwell, and C. C. Patterson. 2016. 'Vaccinations and childhood type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies', *Diabetologia*, 59: 237-43.
- Morgan, R., J. Keen, and C. McGowan. 2015. 'Equine metabolic syndrome', *Vet Rec*, 177: 173-9.
- Murfitt, S. A., P. Zacccone, X. Wang, A. Acharjee, Y. Sawyer, A. Koulman, L. D. Roberts, A. Cooke, and J. L. Griffin. 2018. 'Metabolomics and Lipidomics Study of Mouse Models of Type 1 Diabetes Highlights Divergent Metabolism in Purine and Tryptophan Metabolism Prior to Disease Onset', *J Proteome Res*, 17: 946-60.
- Myette-Cote, E., C. Durrer, H. Neudorf, T. D. Bammert, J. D. Botezelli, J. D. Johnson, C. A. DeSouza, and J. P. Little. 2018. 'The effect of a short-term low-carbohydrate, high-fat diet with or without postmeal walks on glycemic control and inflammation in type 2 diabetes: a randomized trial', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 315: R1210-r19.
- Nam, J. H., B. Cha, J. Y. Park, F. Abekura, C. H. Kim, and J. R. Kim. 2019. 'Mitogen-Induced Interferon Gamma Production in Human Whole Blood: The Effect of Heat and Cations', *Curr Pharm Biotechnol*, 20: 562-72.
- Nanto-Salonen, K., A. Kupila, S. Simell, H. Siljander, T. Salonsaari, A. Hekkala, S. Korhonen, R. Erkkola, J. I. Sipila, L. Haavisto, M. Siltala, J. Tuominen, J. Hakalax, H. Hyoty, J. Ilonen, R. Veijola, T. Simell, M. Knip, and O. Simell. 2008. 'Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial', *Lancet*, 372: 1746-55.

- Nauck, Matthias, Astrid Petersmann, Dirk Müller-Wieland, Erwin Schleicher, Ulrich A. Müller, Rüdiger Landgraf, Guido Freckmann, and Lutz Heinemann. 2018. 'Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus', *Diabetologie und Stoffwechsel*, 13: S90-S96.
- Nekoua, M. P., R. Fachinan, A. K. Atchamou, O. Nouatin, D. Amoussou-Guenou, M. K. Amoussou-Guenou, K. Moutairou, and A. Yessoufou. 2016. 'Modulation of immune cells and Th1/Th2 cytokines in insulin-treated type 2 diabetes mellitus', *Afr Health Sci*, 16: 712-24.
- Nelson, R. W., and C. E. Reusch. 2014. 'Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats', *J Endocrinol*, 222: T1-9.
- Newgard, C. B. 2017. 'Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand?', *Cell Metab*, 25: 43-56.
- Nicolau, J., T. Lequerre, H. Bacquet, and O. Vittecoq. 2017. 'Rheumatoid arthritis, insulin resistance, and diabetes', *Joint Bone Spine*, 84: 411-16.
- Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki, and R. Nagai. 2009. 'CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity', *Nat Med*, 15: 914-20.
- Niu, Xuyan, Cheng Lu, Cheng Xiao, Na Ge, Miao Jiang, Li Li, Yanqin Bian, Gang Xu, Zhaoxiang Bian, Ge Zhang, and Aiping Lu. 2015. 'The Crosstalk of Pathways Involved in Immune Response Maybe the Shared Molecular Basis of Rheumatoid Arthritis and Type 2 Diabetes', *PLoS One*, 10: e0134990-e90.
- Noble, J. A. 2015. 'Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review', *J Autoimmun*, 64: 101-12.
- Norris, J. M., R. K. Johnson, and L. C. Stene. 2020. 'Type 1 diabetes-early life origins and changing epidemiology', *Lancet Diabetes Endocrinol*.
- Nyman, T. A., M. B. Lorey, W. Cypryk, and S. Matikainen. 2017. 'Mass spectrometry-based proteomic exploration of the human immune system: focus on the inflammasome, global protein secretion, and T cells', *Expert Rev Proteomics*, 14: 395-407.
- O'Kell, A. L., C. Wasserfall, B. Catchpole, L. J. Davison, R. S. Hess, J. A. Kushner, and M. A. Atkinson. 2017. 'Comparative Pathogenesis of Autoimmune Diabetes in Humans, NOD Mice, and Canines: Has a Valuable Animal Model of Type 1 Diabetes Been Overlooked?', *Diabetes*, 66: 1443-52.
- O'Neill, L. A., R. J. Kishton, and J. Rathmell. 2016. 'A guide to immunometabolism for immunologists', *Nat Rev Immunol*, 16: 553-65.

- Ohlund, M., A. Egenvall, T. Fall, H. Hansson-Hamlin, H. Rocklinsberg, and B. S. Holst. 2017. 'Environmental Risk Factors for Diabetes Mellitus in Cats', *J Vet Intern Med*, 31: 29-35.
- Olson, N. C., M. F. Doyle, I. H. de Boer, S. A. Huber, N. S. Jenny, R. A. Kronmal, B. M. Psaty, and R. P. Tracy. 2015. 'Associations of Circulating Lymphocyte Subpopulations with Type 2 Diabetes: Cross-Sectional Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)', *PLoS One*, 10: e0139962.
- Osbak, K. K., K. Colclough, C. Saint-Martin, N. L. Beer, C. Bellanne-Chantelot, S. Ellard, and A. L. Gloyn. 2009. 'Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia', *Hum Mutat*, 30: 1512-26.
- Palazon, A., P. A. Tyrakis, D. Macias, P. Velica, H. Rundqvist, S. Fitzpatrick, N. Vojnovic, A. T. Phan, N. Loman, I. Hedenfalk, T. Hatschek, J. Lovrot, T. Foukakis, A. W. Goldrath, J. Bergh, and R. S. Johnson. 2017. 'An HIF-1alpha/VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression', *Cancer Cell*, 32: 669-83.e5.
- Palmer, C. S., T. Hussain, G. Duette, T. J. Weller, M. Ostrowski, I. Sada-Ovalle, and S. M. Crowe. 2016. 'Regulators of Glucose Metabolism in CD4(+) and CD8(+) T Cells', *Int Rev Immunol*, 35: 477-88.
- Palmer, C. S., M. Ostrowski, B. Balderson, N. Christian, and S. M. Crowe. 2015. 'Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions', *Front Immunol*, 6: 1.
- Pardo, F., R. Villalobos-Labra, B. Sobrevia, F. Toledo, and L. Sobrevia. 2018. 'Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus', *Mol Aspects Med*, 60: 81-91.
- Park, Y. S., M. J. Uddin, L. Piao, I. Hwang, J. H. Lee, and H. Ha. 2016. 'Novel Role of Endogenous Catalase in Macrophage Polarization in Adipose Tissue', *Mediators Inflamm*, 2016: 8675905.
- Passalacqua, K. D., J. Lu, I. Goodfellow, A. O. Kolawole, J. R. Arche, R. J. Maddox, K. E. Carnahan, M. X. D. O'Riordan, and C. E. Wobus. 2019. 'Glycolysis Is an Intrinsic Factor for Optimal Replication of a Norovirus', *mBio*, 10.
- Pathiraja, V., J. P. Kuehlich, P. D. Campbell, B. Krishnamurthy, T. Loudovaris, P. T. Coates, T. C. Brodnicki, P. J. O'Connell, K. Kedzierska, C. Rodda, P. Bergman, E. Hill, A. W. Purcell, N. L. Dudek, H. E. Thomas, T. W. Kay, and S. I. Mannering. 2015. 'Proinsulin-specific, HLA-DQ8, and HLA-DQ8-transdimer-restricted CD4+ T cells infiltrate islets in type 1 diabetes', *Diabetes*, 64: 172-82.
- Patterson, Christopher C., Valma Harjutsalo, Joachim Rosenbauer, Andreas Neu, Ondrej Cinek, Torild Skrivarhaug, Birgit Rami-Merhar, Gyula Soltesz, Jannet Svensson, Roger C. Parslow, Conxa Castell, Eugen J. Schoenle, Polly J. Bingley, Gisela Dahlquist, Przemysława K. Jarosz-Chobot, Dalé Marčiulionytė,

- Edna F. Roche, Ulrike Rothe, Natasa Bratina, Constantin Ionescu-Tirgoviste, Ilse Weets, Mirjana Kocova, Valentino Cherubini, Natasa Rojnic Putarek, Carine E. deBeaufort, Mira Samardzic, and Anders Green. 2019. 'Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989–2013: a multicentre prospective registration study', *Diabetologia*, 62: 408-17.
- Pearce, E. L., M. C. Poffenberger, C. H. Chang, and R. G. Jones. 2013. 'Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function', *Science*, 342: 1242454.
- Perelman, A., C. Wachtel, M. Cohen, S. Haupt, H. Shapiro, and A. Tzur. 2012. 'JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry', *Cell Death Dis*, 3: e430.
- Perretti, M., and F. D'Acquisto. 2009. 'Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation', *Nat Rev Immunol*, 9: 62-70.
- Petersmann, A., D. Muller-Wieland, U. A. Muller, R. Landgraf, M. Nauck, G. Freckmann, L. Heinemann, and E. Schleicher. 2019. 'Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus', *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 127: S1-s7.
- Peterson, Richard G., Walter N. Shaw, Mary-Ann Neel, Leah A. Little, and J. Eichberg. 1990. 'Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus', *ILAR Journal*, 32: 16-19.
- Peumans, W. J., W. Zhang, A. Barre, C. Houles Astoul, P. J. Balint-Kurti, P. Rovira, P. Rouge, G. D. May, F. Van Leuven, P. Truffa-Bachi, and E. J. Van Damme. 2000. 'Fruit-specific lectins from banana and plantain', *Planta*, 211: 546-54.
- Pickar-Oliver, A., and C. A. Gersbach. 2019. 'The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 490-507.
- Pietrani, N. T., C. N. Ferreira, K. F. Rodrigues, L. O. Perucci, F. S. Carneiro, A. A. Bosco, M. C. Oliveira, S. S. Pereira, A. L. Teixeira, J. I. Alvarez-Leite, A. V. Ferreira, L. P. Sousa, and K. B. Gomes. 2018. 'Proresolving protein Annexin A1: The role in type 2 diabetes mellitus and obesity', *Biomed Pharmacother*, 103: 482-89.
- Pociot, F., and A. Lernmark. 2016. 'Genetic risk factors for type 1 diabetes', *Lancet*, 387: 2331-39.
- Pound, L. D., P. Kievit, and K. L. Grove. 2014. 'The nonhuman primate as a model for type 2 diabetes', *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21: 89-94.
- Previte, D. M., and J. D. Piganelli. 2018. 'Reactive Oxygen Species and Their Implications on CD4(+) T Cells in Type 1 Diabetes', *Antioxid Redox Signal*, 29: 1399-414.

- Punthakee, Z., R. Goldenberg, and P. Katz. 2018. 'Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome', *Can J Diabetes*, 42 Suppl 1: S10-s15.
- Purvis, G. S. D., M. Collino, R. A. Loiola, A. Baragetti, F. Chiazza, M. Brovelli, M. H. Sheikh, D. Collotta, A. Cento, R. Mastrocola, M. Aragno, J. C. Cutrin, C. Reutelingsperger, L. Grigore, A. L. Catapano, M. M. Yaqoob, G. D. Norata, E. Solito, and C. Thiemermann. 2019. 'Identification of AnnexinA1 as an Endogenous Regulator of RhoA, and Its Role in the Pathophysiology and Experimental Therapy of Type-2 Diabetes', *Front Immunol*, 10: 571.
- Purvis, G. S. D., E. Solito, and C. Thiemermann. 2019. 'Annexin-A1: Therapeutic Potential in Microvascular Disease', *Front Immunol*, 10: 938.
- Purvis, Gareth S. D., Fausto Chiazza, Jianmin Chen, Rodrigo Azevedo-Loiola, Lukas Martin, Dennis H. M. Kusters, Chris Reutelingsperger, Nikolaos Fountoulakis, Luigi Gnudi, Muhammed M. Yaqoob, Massimo Collino, Christoph Thiemermann, and Egle Solito. 2018. 'Annexin A1 attenuates microvascular complications through restoration of Akt signalling in a murine model of type 1 diabetes', *Diabetologia*, 61: 482-95.
- Radenkovic, M., C. Silver, J. Arvastsson, K. Lynch, A. Lernmark, R. A. Harris, C. D. Agardh, and C. M. Cilio. 2016. 'Altered regulatory T cell phenotype in latent autoimmune diabetes of the adults (LADA)', *Clin Exp Immunol*, 186: 46-56.
- Ragno, V. M., G. A. Zello, C. D. Klein, and J. B. Montgomery. 2019. 'From Table to Stable: A Comparative Review of Selected Aspects of Human and Equine Metabolic Syndrome', *J Equine Vet Sci*, 79: 131-38.
- Rankin, Matthew M., and Jake A. Kushner. 2009. 'Adaptive  $\beta$ -Cell Proliferation Is Severely Restricted With Advanced Age', *Diabetes*, 58: 1365-72.
- Redondo, M. J., A. K. Steck, and A. Pugliese. 2018. 'Genetics of type 1 diabetes', *Pediatr Diabetes*, 19: 346-53.
- Reed, J. C., and K. C. Herold. 2015. 'Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM', *Nat Rev Endocrinol*, 11: 308-14.
- Renner, S., A. Blutke, S. Clauss, C. A. Deeg, E. Kemter, D. Merkus, R. Wanke, and E. Wolf. 2020. 'Porcine models for studying complications and organ crosstalk in diabetes mellitus', *Cell Tissue Res*.
- Renner, S., C. Braun-Reichhart, A. Blutke, N. Herbach, D. Emrich, E. Streckel, A. Wunsch, B. Kessler, M. Kurome, A. Bahr, N. Klymiuk, S. Krebs, O. Puk, H. Nagashima, J. Graw, H. Blum, R. Wanke, and E. Wolf. 2013. 'Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs', *Diabetes*, 62: 1505-11.
- Renner, S., B. Dobenecker, A. Blutke, S. Zols, R. Wanke, M. Ritzmann, and E. Wolf. 2016. 'Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research', *Theriogenology*, 86: 406-21.

- Renner, S., C. Fehlings, N. Herbach, A. Hofmann, D. C. von Waldthausen, B. Kessler, K. Ulrichs, I. Chodnevskaia, V. Moskalenko, W. Amselgruber, B. Goke, A. Pfeifer, R. Wanke, and E. Wolf. 2010. 'Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function', *Diabetes*, 59: 1228-38.
- Rewers, M., and J. Ludvigsson. 2016. 'Environmental risk factors for type 1 diabetes', *Lancet*, 387: 2340-48.
- Reynolds, A., J. A. Keen, T. Fordham, and R. A. Morgan. 2019. 'Adipose tissue dysfunction in obese horses with equine metabolic syndrome', *Equine Vet J*, 51: 760-66.
- Riahi, Y., T. Israeli, E. Cerasi, and G. Leibowitz. 2018. 'Effects of proinsulin misfolding on beta-cell dynamics, differentiation and function in diabetes', *Diabetes Obes Metab*, 20 Suppl 2: 95-103.
- Richard, C., M. Wadowski, S. Goruk, L. Cameron, A. M. Sharma, and C. J. Field. 2017. 'Individuals with obesity and type 2 diabetes have additional immune dysfunction compared with obese individuals who are metabolically healthy', *BMJ Open Diabetes Res Care*, 5: e000379.
- Rieckmann, J. C., R. Geiger, D. Hornburg, T. Wolf, K. Kveler, D. Jarrossay, F. Sallusto, S. S. Shen-Orr, A. Lanzavecchia, M. Mann, and F. Meissner. 2017. 'Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics', *Nat Immunol*, 18: 583-93.
- Robbiano, L., E. Mereto, C. Corbu, and G. Brambilla. 1996. 'DNA damage induced by seven N-nitroso compounds in primary cultures of human and rat kidney cells', *Mutat Res*, 368: 41-7.
- Robbins, P. D., A. Dorransoro, and C. N. Booker. 2016. 'Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles', *J Clin Invest*, 126: 1173-80.
- Robertson, C. C., and S. S. Rich. 2018. 'Genetics of type 1 diabetes', *Curr Opin Genet Dev*, 50: 7-16.
- Roep, B. O., D. C. S. Wheeler, and M. Peakman. 2019. 'Antigen-based immune modulation therapy for type 1 diabetes: the era of precision medicine', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 7: 65-74.
- Ronacher, K., S. A. Joosten, R. van Crevel, H. M. Dockrell, G. Walzl, and T. H. Ottenhoff. 2015. 'Acquired immunodeficiencies and tuberculosis: focus on HIV/AIDS and diabetes mellitus', *Immunol Rev*, 264: 121-37.
- Rosik, J., B. Szostak, F. Machaj, and A. Pawlik. 2020. 'The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus', *Ann Hum Genet*, 84: 114-24.

- Russell, A. E., S. Jun, S. Sarkar, W. J. Geldenhuys, S. E. Lewis, S. L. Rellick, and J. W. Simpkins. 2019. 'Extracellular Vesicles Secreted in Response to Cytokine Exposure Increase Mitochondrial Oxygen Consumption in Recipient Cells', *Front Cell Neurosci*, 13: 51.
- Rutman, A. K., S. Negi, M. Gasparini, C. P. Hasilo, J. Tchervenkov, and S. Paraskevas. 2018. 'Immune Response to Extracellular Vesicles From Human Islets of Langerhans in Patients With Type 1 Diabetes', *Endocrinology*, 159: 3834-47.
- Saalmueller, A.; Gerner, W. 2016. 'The Immune System of Swine', *Encyclopedia of Immunobiology*.
- Saalmuller, A., M. J. Reddehase, H. J. Buhning, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski. 1987. 'Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes', *Eur J Immunol*, 17: 1297-301.
- Sadeharju, K., A. M. Hamalainen, M. Knip, M. Lonrot, P. Koskela, S. M. Virtanen, J. Ilonen, H. K. Akerblom, and H. Hyoty. 2003. 'Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial', *Clin Exp Immunol*, 132: 271-7.
- Saeedi, P., I. Petersohn, P. Salpea, B. Malanda, S. Karuranga, N. Unwin, S. Colagiuri, L. Guariguata, A. A. Motala, K. Ogurtsova, J. E. Shaw, D. Bright, and R. Williams. 2019. 'Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition', *Diabetes Res Clin Pract*, 157: 107843.
- Saisho, Yoshifumi, Alexandra E. Butler, Erica Manesso, David Elashoff, Robert A. Rizza, and Peter C. Butler. 2013. ' $\beta$ -Cell Mass and Turnover in Humans', *Effects of obesity and aging*, 36: 111-17.
- Sedlak, C., M. Patzl, A. Saalmuller, and W. Gerner. 2014. 'CD2 and CD8alpha define porcine gammadelta T cells with distinct cytokine production profiles', *Dev Comp Immunol*, 45: 97-106.
- Sena, L. A., S. Li, A. Jairaman, M. Prakriya, T. Ezponda, D. A. Hildeman, C. R. Wang, P. T. Schumacker, J. D. Licht, H. Perlman, P. J. Bryce, and N. S. Chandel. 2013. 'Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling', *Immunity*, 38: 225-36.
- Senoner, T., and W. Dichtl. 2019. 'Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target?', *Nutrients*, 11.
- Seyfarth, J., K. Fortsch, H. Ahlert, H. J. Laws, B. Karges, R. Deenen, K. Kohrer, E. Mayatepek, T. Meissner, and M. Jacobsen. 2017. 'Dominant TNFalpha and impaired IL-2 cytokine profiles of CD4(+) T cells from children with type-1 diabetes', *Immunol Cell Biol*, 95: 630-39.

- Seyyedebrahimi, S., H. Khodabandehloo, E. Nasli Esfahani, and R. Meshkani. 2018. 'The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial', *Acta Diabetol*, 55: 341-53.
- Shao, G., H. Zhou, Q. Zhang, Y. Jin, and C. Fu. 2019. 'Advancements of Annexin A1 in inflammation and tumorigenesis', *Onco Targets Ther*, 12: 3245-54.
- Sheikh, M. H., and E. Solito. 2018. 'Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein', *Int J Mol Sci*, 19.
- Shields, B., and K. Colclough. 2017. 'Towards a systematic nationwide screening strategy for MODY', *Diabetologia*, 60: 609-12.
- Shields, B. M., S. Hicks, M. H. Shepherd, K. Colclough, A. T. Hattersley, and S. Ellard. 2010. 'Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing?', *Diabetologia*, 53: 2504-08.
- Shin, B., G. A. Benavides, J. Geng, S. B. Koralov, H. Hu, V. M. Darley-USmar, and L. E. Harrington. 2020. 'Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Regulates the Fate Decision between Pathogenic Th17 and Regulatory T Cells', *Cell Rep*, 30: 1898-909.e4.
- Shutova, M. S., and T. M. Svitkina. 2018. 'Mammalian nonmuscle myosin II comes in three flavors', *Biochem Biophys Res Commun*, 506: 394-402.
- Sinclair, L. V., J. Rolf, E. Emslie, Y. B. Shi, P. M. Taylor, and D. A. Cantrell. 2013. 'Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation', *Nat Immunol*, 14: 500-8.
- Sinkora, M., and J. E. Butler. 2016. 'Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes', *Dev Comp Immunol*, 58: 1-17.
- Sipos, W. 2019. 'Shifts in porcine PBMC populations from adolescence to adulthood', *Vet Immunol Immunopathol*, 211: 35-37.
- Sipos, W., C. J. Duvigneau, R. T. Hartl, and I. Schwendenwein. 2011. 'Exploratory reference intervals on hematology and cellular immune system of multiparous Large White sows', *Vet Immunol Immunopathol*, 141: 307-11.
- Song, B., T. Li, S. Chen, D. Yang, L. Luo, T. Wang, X. Han, L. Bai, and A. Ma. 2016. 'Correlations between MTP and ROS Levels of Peripheral Blood Lymphocytes and Readmission in Patients with Chronic Heart Failure', *Heart Lung Circ*, 25: 296-302.
- Sousa, M., and J. Bruges-Armas. 2019. 'Monogenic Diabetes: Genetics and Relevance on Diabetes Mellitus Personalized Medicine', *Curr Diabetes Rev*.
- Srenathan, U., K. Steel, and L. S. Taams. 2016. 'IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease', *Immunol Lett*, 178: 20-6.

- Stoy, J., E. L. Edghill, S. E. Flanagan, H. Ye, V. P. Paz, A. Pluzhnikov, J. E. Below, M. G. Hayes, N. J. Cox, G. M. Lipkind, R. B. Lipton, S. A. Greeley, A. M. Patch, S. Ellard, D. F. Steiner, A. T. Hattersley, L. H. Philipson, and G. I. Bell. 2007. 'Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 15040-4.
- Strauss, A., V. Moskalenko, C. Tiurbe, I. Chodnevskaia, S. Timm, V. A. Wiegering, C. T. Germer, and K. Ulrichs. 2012. 'Goettingen Minipigs (GMP): Comparison of Two Different Models for Inducing Diabetes', *Diabetol Metab Syndr*, 4: 7.
- Surwit, R. S., C. M. Kuhn, C. Cochrane, J. A. McCubbin, and M. N. Feinglos. 1988. 'Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice', *Diabetes*, 37: 1163-7.
- Takamatsu, H. H., M. S. Denyer, C. Stirling, S. Cox, N. Aggarwal, P. Dash, T. E. Wileman, and P. V. Barnett. 2006. 'Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection', *Vet Immunol Immunopathol*, 112: 49-61.
- Talker, S. C., T. Kaser, K. Reutner, C. Sedlak, K. H. Mair, H. Koinig, R. Graage, M. Viehmann, E. Klingler, A. Ladinig, M. Ritzmann, A. Saalmuller, and W. Gerner. 2013. 'Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets', *Dev Comp Immunol*, 40: 51-68.
- Taniyama, H., T. Shirakawa, H. Furuoka, S. Osame, N. Kitamura, and K. Miyazawa. 1993. 'Spontaneous diabetes mellitus in young cattle: histologic, immunohistochemical, and electron microscopic studies of the islets of Langerhans', *Vet Pathol*, 30: 46-54.
- Touch, S., K. Clement, and S. Andre. 2017. 'T Cell Populations and Functions Are Altered in Human Obesity and Type 2 Diabetes', *Curr Diab Rep*, 17: 81.
- Travers, R. L., A. C. Motta, J. A. Betts, A. Bouloumie, and D. Thompson. 2015. 'The impact of adiposity on adipose tissue-resident lymphocyte activation in humans', *Int J Obes (Lond)*, 39: 762-9.
- Trivedi, P., K. L. Graham, B. Krishnamurthy, S. Fynch, R. M. Slattery, T. W. Kay, and H. E. Thomas. 2016. 'Perforin facilitates beta cell killing and regulates autoreactive CD8+ T-cell responses to antigen in mouse models of type 1 diabetes', *Immunol Cell Biol*, 94: 334-41.
- Van de Velde, H., G. P. Janssens, H. de Rooster, I. Polis, I. Peters, R. Ducatelle, P. Nguyen, J. Buyse, K. Rochus, J. Xu, A. Verbrugge, and M. Hesta. 2013. 'The cat as a model for human obesity: insights into depot-specific inflammation associated with feline obesity', *Br J Nutr*, 110: 1326-35.
- van der Windt, G. J. W., C. H. Chang, and E. L. Pearce. 2016. 'Measuring Bioenergetics in T Cells Using a Seahorse Extracellular Flux Analyzer', *Curr Protoc Immunol*, 113: 3.16b.1-3.16b.14.

- Van Name, M. A., P. Cheng, R. L. Gal, C. Kollman, J. Lynch, B. Nelson, and W. V. Tamborlane. 2020. 'Children and adolescents with type 1 and type 2 diabetes mellitus in the Pediatric Diabetes Consortium Registries: comparing clinical characteristics and glycaemic control', *Diabet Med*.
- van Niekerk, G., C. Christowitz, D. Conradie, and A. M. Engelbrecht. 2019. 'Insulin as an immunomodulatory hormone', *Cytokine Growth Factor Rev*.
- van Niekerk, G., T. Davis, H. G. Patterson, and A. M. Engelbrecht. 2019. 'How Does Inflammation-Induced Hyperglycemia Cause Mitochondrial Dysfunction in Immune Cells?', *Bioessays*, 41: e1800260.
- Verkest, K. R., J. S. Rand, L. M. Fleeman, and J. M. Morton. 2012. 'Spontaneously obese dogs exhibit greater postprandial glucose, triglyceride, and insulin concentrations than lean dogs', *Domest Anim Endocrinol*, 42: 103-12.
- Viigimaa, M., A. Sachinidis, M. Toumpourleka, K. Koutsampasopoulos, S. Alliksoo, and T. Titma. 2020. 'Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus', *Curr Vasc Pharmacol*, 18: 110-16.
- Von Ah Morano, A. E., G. P. Dorneles, A. Peres, and F. S. Lira. 2020. 'The role of glucose homeostasis on immune function in response to exercise: The impact of low or higher energetic conditions', *Journal of cellular physiology*, 235: 3169-88.
- Walker, L. S., and M. von Herrath. 2016. 'CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes', *Clin Exp Immunol*, 183: 16-29.
- Walter, P., and D. Ron. 2011. 'The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation', *Science*, 334: 1081-6.
- Walters, E. M., E. Wolf, J. J. Whyte, J. Mao, S. Renner, H. Nagashima, E. Kobayashi, J. Zhao, K. D. Wells, J. K. Critser, L. K. Riley, and R. S. Prather. 2012. 'Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model', *BMC Med Genomics*, 5: 55.
- Wang, J., T. Takeuchi, S. Tanaka, S. K. Kubo, T. Kayo, D. Lu, K. Takata, A. Koizumi, and T. Izumi. 1999. 'A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse', *J Clin Invest*, 103: 27-37.
- Wang, N., F. Zhu, L. Chen, and K. Chen. 2018. 'Proteomics, metabolomics and metagenomics for type 2 diabetes and its complications', *Life Sci*, 212: 194-202.
- Wang, R., and L. A. Solt. 2016. 'Metabolism of murine TH 17 cells: Impact on cell fate and function', *Eur J Immunol*, 46: 807-16.
- Wang, Z., Z. Chen, J. Yang, Z. Yang, J. Yin, G. Zuo, X. Duan, H. Shen, H. Li, and G. Chen. 2017. 'Identification of two phosphorylation sites essential for annexin A1

- in blood-brain barrier protection after experimental intracerebral hemorrhage in rats', *J Cereb Blood Flow Metab*, 37: 2509-25.
- Wasserman, H., R. B. Hufnagel, V. Miraldi Utz, K. Zhang, C. A. Valencia, N. D. Leslie, and N. A. Crimmins. 2016. 'Bilateral cataracts in a 6-yr-old with new onset diabetes: a novel presentation of a known INS gene mutation', *Pediatr Diabetes*, 17: 535-39.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr. 2003. 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue', *J Clin Invest*, 112: 1796-808.
- Widlansky, M. E., J. Wang, S. M. Shenouda, T. M. Hagen, A. R. Smith, T. J. Kizhakekuttu, M. A. Kluge, D. Weihrauch, D. D. Gutterman, and J. A. Vita. 2010. 'Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes', *Transl Res*, 156: 15-25.
- Wiles, T. A., R. Powell, R. Michel, K. S. Beard, A. Hohenstein, B. Bradley, N. Reisdorph, K. Haskins, and T. Delong. 2019. 'Identification of Hybrid Insulin Peptides (HIPs) in Mouse and Human Islets by Mass Spectrometry', *J Proteome Res*, 18: 814-25.
- Williams, M. C., C. J. McMillan, E. R. Snead, K. Takada, and P. K. Chelikani. 2019. 'Association of circulating adipokine concentrations with indices of adiposity and sex in healthy, adult client owned cats', *BMC Vet Res*, 15: 332.
- Williams, R., S. Karuranga, B. Malanda, P. Saeedi, A. Basit, S. Besancon, C. Bommer, A. Esteghamati, K. Ogurtsova, P. Zhang, and S. Collagiuri. 2020. 'Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition', *Diabetes Res Clin Pract*. 108072.
- Wisniewski, J. R. 2018. 'Filter-Aided Sample Preparation for Proteome Analysis', *Methods Mol Biol*, 1841: 3-10.
- Wolf, E., C. Braun-Reichhart, E. Streckel, and S. Renner. 2014. 'Genetically engineered pig models for diabetes research', *Transgenic Res*, 23: 27-38.
- Writing Group for the Trigr Study Group. 2018. 'Effect of Hydrolyzed Infant Formula vs Conventional Formula on Risk of Type 1 Diabetes: The TRIGR Randomized Clinical Trial', *Jama*, 319: 38-48.
- Xia, Y., Z. Xie, G. Huang, and Z. Zhou. 2019. 'Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants', *Diabetes Metab Res Rev*, 35: e3075.
- Xu, X., Y. Shi, Y. Cai, Q. Zhang, F. Yang, H. Chen, Y. Gu, M. Zhang, L. Yu, and T. Yang. 2013. 'Inhibition of increased circulating Tfh cell by anti-CD20 monoclonal antibody in patients with type 1 diabetes', *PLoS One*, 8: e79858.

- Yan, L. J. 2014. 'Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress', *J Diabetes Res*, 2014: 137919.
- Yang, Y. H., W. Song, J. A. Deane, W. Kao, J. D. Ooi, D. Ngo, A. R. Kitching, E. F. Morand, and M. J. Hickey. 2013. 'Deficiency of annexin A1 in CD4+ T cells exacerbates T cell-dependent inflammation', *J Immunol*, 190: 997-1007.
- Yin, Y., S. C. Choi, Z. Xu, D. J. Perry, H. Seay, B. P. Croker, E. S. Sobel, T. M. Brusko, and L. Morel. 2015. 'Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus', *Sci Transl Med*, 7: 274ra18.
- Yoshioka, M., T. Kayo, T. Ikeda, and A. Koizumi. 1997. 'A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice', *Diabetes*, 46: 887-94.
- Yu, Z. W., J. Zhang, X. Li, Y. Wang, Y. H. Fu, and X. Y. Gao. 2020. 'A new research hot spot: The role of NLRP3 inflammasome activation, a key step in pyroptosis, in diabetes and diabetic complications', *Life Sci*, 240: 117138.
- Zatterale, F., M. Longo, J. Naderi, G. A. Raciti, A. Desiderio, C. Miele, and F. Beguinot. 2019. 'Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes', *Front Physiol*, 10: 1607.
- Zhang, J., and Q. Zhang. 2019. 'Using Seahorse Machine to Measure OCR and ECAR in Cancer Cells', *Methods Mol Biol*, 1928: 353-63.
- Zhang, Y., X. F. Pan, J. Chen, L. Xia, A. Cao, Y. Zhang, J. Wang, H. Li, K. Yang, K. Guo, M. He, and A. Pan. 2020. 'Combined lifestyle factors and risk of incident type 2 diabetes and prognosis among individuals with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies', *Diabetologia*, 63: 21-33.
- Zhao, R., D. Tang, S. Yi, W. Li, C. Wu, Y. Lu, X. Hou, J. Song, P. Lin, L. Chen, and L. Sun. 2014. 'Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes', *PLoS One*, 9: e85770.
- Zheng, Y., S. H. Ley, and F. B. Hu. 2018. 'Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications', *Nat Rev Endocrinol*, 14: 88-98.
- Zhou, T., Z. Hu, S. Yang, L. Sun, Z. Yu, and G. Wang. 2018. 'Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus', *J Diabetes Res*, 2018: 7457269.
- Zhu, P., W. Jiang, L. Cao, W. Yu, Y. Pei, X. Yang, B. Wan, J. O. Liu, Q. Yi, and L. Yu. 2010. 'IL-2 mRNA stabilization upon PMA stimulation is dependent on NF90-Ser647 phosphorylation by protein kinase Cbeta1', *J Immunol*, 185: 5140-9.

---

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich an erster Stelle herzlichst bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Cornelia Deeg bedanken. Mit der Vergabe dieses Themas hat sie in mir die Faszination für die Immunologie geweckt und mir ermöglicht, in einem hochaktuellen und bedeutsamen Forschungsgebiet zu promovieren. Ein großes Dankeschön für die kontinuierliche Unterstützung, für die ständige Erreichbarkeit und Zuverlässigkeit. Ich weiß dieses Engagement sehr zu schätzen und möchte mich herzlich für diese außerordentliche Betreuung bedanken.

Mein Dank gilt im Weiteren dem Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, unter der Leitung von Prof. Dr. Eckhard Wolf, für die außerordentlich gute Kooperation und die Möglichkeit, die Blutproben der Ferkel zu erhalten. Insbesondere möchte ich mich hierbei herzlich bei Dr. Simone Renner bedanken, die für Probennahmen immer alles möglich gemacht und mich in der Zeit in bemerkenswerter Art und Weise unterstützt hat. Ein großes Dankeschön auch an Dr. Silja Zettler, Dr. Arne Hinrichs, Harald Paul und an alle weiteren Mitarbeiter des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie für die ständige Einsatzbereitschaft und praktische Hilfe, für viele nette Worte und neue Lösungsansätze.

Im Weiteren möchte ich mich bei Dr. Stefanie Hauck aus dem Helmholtz Zentrum München bedanken, unter deren Leitung die proteomischen Versuche durchgeführt wurden und die mir mit ihrer Expertise jederzeit hilfsbereit und kompetent zur Seite stand.

Ich möchte Barbara Amann danken für ihre große Unterstützung in der graphischen Umsetzung von Ergebnissen sowie Sieglinde Hirmer, mit deren Hilfe und Wissen aus langjähriger Erfahrung alle labortechnischen Hürden gemeistert werden konnten.

Der ganzen Arbeitsgruppe Deeg gilt ein besonderer Dank für ihre ständige Hilfsbereitschaft und für die vielen schönen, gemeinsamen Momente. Dr. Roxane Degroote, Dr. Carmen Wiedemann, Dr. Bernhard Hobmaier, Lea Lorenz, Claudia Barfuß, Franziska Stetter, Maria Weigand und Dr. Kristina Kleinwort, ihr wart tolle Kollegen. Auf eure Hilfe und Unterstützung konnte ich mich immer verlassen, ein riesiges Dankeschön an euch.

---

Besonders danken möchte ich meiner lieben Familie für ihre bedingungslose Unterstützung in der Realisierung meiner Träume und Ziele. Meine Eltern haben mir alles ermöglicht, mich stets motiviert und mir den Rücken gestärkt. Ihnen widme ich diese Arbeit. Ich danke euch von Herzen.

Meine Schwester Rike und Beatrix haben ebenfalls ein großes Dankeschön verdient. Ihr habt mich während der gesamten Zeit immer wieder mit positiven Worten aufgebaut und mich ermutigt. Euer bereitwilliges und schnelles Korrekturlesen hat die Fertigstellung dieser Arbeit maßgeblich unterstützt.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei dir bedanken, Josef. Ich danke dir für deine Geduld und dein Verständnis, für deine stetige Unterstützung und für den Rückhalt, den du mir gibst.