



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Destruction, regeneration and replacement of beta-cells and aspects of immune-intervention in type 1 diabetes

Alkemade, G.M.

Citation

Alkemade, G. M. (2016, May 19). *Destruction, regeneration and replacement of beta-cells and aspects of immune-intervention in type 1 diabetes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/39620>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/39620>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/39620> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Alkemade, Gonnje

Title: Destruction, regeneration and replacement of beta-cells and aspects of immune-intervention in type 1 diabetes

Issue Date: 2016-05-19



8

Summary

Nederlandse samenvatting

Acknowledgement/
Dankwoord

Publications

Curriculum Vitae

SUMMARY

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a chronic disease caused by autoimmune mediated destruction of insulin producing beta-cells in the islets of Langerhans in the pancreas. Currently there is no cure; treatment consists of frequent or continuous insulin administration to mimic beta-cell function. Despite intensive insulin therapy, T1DM still contributes substantially to morbidity and mortality.

Over the last decades, much progress has been made in our understanding of the pathophysiology and possible starting points of treatment of T1DM. In spite of this progress, many questions remain unanswered. We know that T1DM is a T-cell mediated autoimmune disease, but the prerequisites for T-cell recruitment to the endogenous pancreatic islets are not fully understood. Specifically, it is unknown whether antigen presence is a prerequisite for T-cell recruitment. The first part of this thesis addresses beta-cell destruction. There is evidence that functional beta-cell mass can be restored after successful immune intervention in diabetes rodent models but we do not know the source of new insulin producing cells nor the role of ongoing autoimmunity in this process. The second part of this thesis hence addresses beta-cell regeneration. Clinical islet transplantation is an accepted treatment in a small subset of T1DM patients. Yet, little is known about T-cell recruitment to islet transplants either. Furthermore there is a growing interest in the contribution of memory T-cells to recurrent autoimmunity in graft failure. T-cell antigen recognition and beta-cell destruction pathways have been largely unraveled, but it is unclear whether we can protect beta-cells by compromising these processes simultaneously, hence whether we can evade the immune system. The third part of this thesis addresses aspects of beta-cell replacement. Clinical trials have shown that anti-CD3 antibodies can temporarily preserve beta-cell function in recent onset T1DM patients, but it is not known how safe this treatment is in terms of recall immunity (the immune reaction towards pathogens to which patients have been exposed) and preservation of desired immunity against tumours. The fourth and final part of this thesis addresses aspects of immune intervention.

A major rodent model in T1DM research is the non-obese diabetes (NOD) mouse, originally developed in Japan during the selection of a cataract-prone strain. The NOD mouse spontaneously develops an autoimmune form of diabetes, sharing genetic and immuno-pathological features with human T1DM.

Yet, despite the similarities between mice and men in the development of autoimmune diabetes there are many more differences, emphasizing prudence in translating results. Because accessibility to human pancreases during the course of the disease is limited and because reliable biomarkers of both disease activity and aspects of intervention such as efficacy and safety are not readily available, many studies currently rely on animal models.

Beta-cell destruction

The prerequisites for T-cell recruitment to the pancreas that precedes beta-cell destruction are not fully determined. Clinical autopsy studies of recent onset T1DM patients compellingly indicate *antigen*-specific infiltration of auto reactive CD8+ T-cells into insulinitic pancreas lesions. However, studies in a number of infection and autoimmune disease models have suggested additional (bystander) T-cell recruitment in a *non*-antigen specific manner, for instance via cytokines and chemokines.

In **Chapter 2** we monitored the recruitment of CD8+ T-cells, specific for the prevailing diabetogenic epitope *islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein* (IGRP)₂₀₆₋₂₁₄ in gene targeted non-obese diabetic (NOD) mice expressing a T cell 'invisible' IGRP₂₀₆₋₂₁₄ epitope. The aim of our study was to ascertain whether local expression of cognate pMHC is a prerequisite for the recruitment to and/ or the accumulation of CD8+ T-cells in the pancreas during the development of spontaneous autoimmune diabetes. These mice with IGRP epitope invisible islets developed insulinitis and autoimmune diabetes with the same incidence and kinetics as wildtype NOD mice. As opposed to wildtype NOD mice, however, the islet-associated T-cells of these pre-diabetic mice did not contain IGRP epitope reactive CD8+ cells. Additional adoptive transfer experiments revealed that recruitment of both naïve and pre-activated IGRP reactive CD8+ T-cell to the inflamed islets of pre-diabetic NOD mice expressing the T-cell invisible IGRP epitope was severely impaired. Furthermore, pre-activated IGRP specific cytotoxic T lymphocytes failed to home to the insulinitic lesions of these gene-targeted NOD mice. These data indicate that local expression of a specific antigen is a prerequisite for the recruitment to and/ or accumulation of their cognate memory CD8+ T-cells in the pancreatic islets during the development of spontaneous autoimmune diabetes. Our data also show that removing a major diabetogenic epitope in NOD mice, such as IGRP, will not suffice in preventing diabetes nor will it influence the course of the disease. This was illustrated by the significant increase in recruitment of other auto reactive T cell specificities such as insulin-B₁₅₋₂₃ reactive CD8+ T-cells. However, inducing tolerance via the induction of regulatory T-cells may be a possibility to interfere with T-cell recruitment. The rationale behind this treatment is that regulation of one specific attack might subsequently cause regulation of attacks against other beta cell targets. Furthermore the importance of antigen presence underscores the importance of memory. Strategies that interfere with memory in particular or with (re)migration to pancreatic islets therefore are worthwhile exploring too. Contributions to understanding the complex process of T-cell recruitment to endogenous islets during development of T1DM could bring us a step closer to intervening in this process. Our findings specifically could be an argument in favour of further pursuing antigen-specific therapies.

Beta-cell regeneration

It is estimated that at diagnose of T1DM 40-90% of the beta-cells have been destroyed. Among the number of issues that need to be addressed in T1DM research, finding a way to restore the severely compromised beta-cell mass/ function is one of these. The

availability of therapies that decrease insulin requirements and normalize glycemia in T1DM patients and that can fully reverse hyperglycemia in newly diagnosed diabetic NOD mice, raises the question of how functional beta cell mass could be restored after successful immune intervention. In addition, the worldwide scarcity of pancreas/islet allografts as an alternative for restoration of beta-cell mass/ function, fuels the exploration of the beta-cell regenerative capacity.

Proposed mechanisms of beta-cell regeneration are replication of pre-existing beta cells, islet neogenesis from progenitor/ stem cells or non-beta-cells (via transdifferentiation for instance from alpha cells) and recovery of exhausted beta cells. However, the true origin of new insulin-producing cells in preclinical mousemodels remains difficult to prove.

In **Chapter 3** we describe the development of cell lineage tracing models in mice that spontaneously develop autoimmune diabetes. The technique of cell lineage tracing is based on the inheritable labelling of individual islet cells. The introduced individual transgenes to facilitate Red Fluorescent Protein (RFP, the tracer) expression did not interfere with diabetes susceptibility. The RFP labelling of pre-existing beta-cells in our two different models (NOD.RIP-tTA/tet07-Cre.ROSA-tdRFP and NOD.RIPCreER.ROSA-tdRFP) showed to be bright, cell type specific and achieved labelling percentages beyond 90%. Expression of RFP in pre-existing alpha-cells in NOD.GluCre.ROSA-tdRFP mice was somewhat lower (around 60%). Until this thesis, beta-cell regeneration studies had been performed in non-autoimmune cell lineage tracing models. As the mice in our cell lineage tracing models spontaneously develop an autoimmune form of diabetes, these could be used to address the origin of insulin producing cells after immune-intervention in preclinical studies, especially when combined with BrdU labeling, which indicates cell replication. Furthermore these novel models could reveal the role of ongoing autoimmunity on beta-cell regeneration, which most likely will suppress any form of beta-cell regeneration. A caveat in clinically translating rodent study findings are the possible differences in regenerative pathways and regenerative capacity between species. Yet, with model limitations in mind, cell lineage tracing studies might give some clues and guidance as to what regenerative pathways may be considered. Identifying regenerative pathways could eventually result in developing strategies capable of enhancing effectiveness of promising immune therapies.

Beta-cell replacement

Currently islet transplantation is an accepted therapy for patients with complete insulin deficiency, unstable glycemic control and repeated severe hypoglycemia in spite of optimal diabetes management and compliance, however challenges in clinical islet transplantation are plenty.

There is a growing interest in the role of recurrent or ongoing autoimmunity in the outcome of allograft islet transplantation. In **Chapter 4** we tested whether T-cell recruitment in an islet transplantation model is comparable to T-cell recruitment into endogenous islets as described in Chapter 2. We monitored recruitment of epitope IGRP₂₀₆₋₂₁₄ specific

CD8⁺ T-cells into epitope competent or epitope invisible grafts transplanted either in diabetic wildtype NOD mice (harboring both naive and memory IGRP epitope specific T-cells) or epitope invisible hosts (harboring only naive IGRP epitope specific T-cells). All four host-donor combinations had development of recurrent diabetes within two weeks, indicating that IGRP contributes to, but is dispensable for, graft destruction in diabetic IGRP₂₀₆₋₂₁₄ competent hosts. Wildtype hosts recruited epitope specific T-cells into epitope competent, but not epitope invisible grafts. In epitope-invisible hosts, there is no recruitment of epitope specific T-cells, regardless of donortype. We demonstrated that absence of an auto-antigen in syngeneic islet grafts in diabetic hosts renders the grafts 'invisible' to cognate memory (and naive) T-cells, comparable to T cell recruitment to endogenous islets, as described in Chapter 2. Graft derived IGRP₂₀₆₋₂₁₄ did activate naive IGRP₂₀₆₋₂₁₄ CD8⁺ T-cells, but graft destruction by memory T-cells invariably predated their recruitment. Our results indicate that recurrent diabetes in the absence of allo-immunity, is driven by autoreactive T-cells primed during the primary immune response. Our findings that previously primed auto-reactive T-cells drive recurrent autoimmunity underscores the importance of developing immune strategies to tackle autoreactive T-cell memory after beta-cell replacement therapy and has possible implications for the selection and treatment of T1DM candidate islet recipients. Indeed, studies in clinical islet transplantation from our group had previously demonstrated that reactivation of memory islet autoreactive T-cells is a paramount hurdle to achieve or preserve insulin-independence in transplanted T1D patients, implying that current immune suppressive strategies remain insufficient to deal this autoimmune memory and point to the need of novel immune suppressive therapies targeting memory T-cells. We contend that our preclinical model may be of service for validation studies here.

Transplantation of genetically immune protected islets to elude host immune responses could be one approach to improve clinical outcome. In **Chapter 5** we tested whether compromised immune recognition by down-regulation of MHC-I expression (a molecule necessary for antigen presentation to CD8⁺ T-cells), combined with inhibition of the cytotoxic granzyme B activity (an enzyme involved in the actual beta-cell killing) via genetically engineered US2/Serpin 9 expression, protects human beta-cells from acute recurrent islets autoimmunity. We showed *in vitro* and *in vivo* that dispersed primary human islet-cells could be efficiently transduced by lentiviral vectors into self-reaggregating pseudo-islets, histologically and functionally comparable to wild type islets. The protective effect of these strategies was demonstrated in surrogate beta-cells and human primary beta cells in which insulin release upon glucose stimulation was maintained despite co-culturing these cells with cytotoxic T-lymphocytes (CTL) against pre-pro-insulin (PPI). These auto-reactive T-cells were derived from a recent onset T1DM patient. We furthermore designed a preclinical humanized mouse model to allow assessment of the fate of primary human beta-cells in an autoimmune environment. Upon co-transplantation with PPI-directed CTLs under the kidney capsule of NOD.SCID. IL-2R^{-/-}; (NSG) mice, immune protected islets maintained insulin secretion as opposed to non-protected controls, indicating that US2/ Serpin 9 expression does not impact islet

viability *in vivo* and does protect beta-cells from autoimmune CTL attack. Our findings indicate that immune evasion using lentiviral vectors does not negatively affect islet quality and that it protects beta-cells against auto-immunity.

In order to assess immune protection, reliable measurements of beta-cell toxicity are required. Beta-cell toxicity measurements however are influenced by the quality of the isolated islet fraction, as islet preparations contain a mixture of cell types, including beta-cells, alpha-cells, duct cells and endothelial cells. In **Chapter 5** we additionally describe a successful strategy to measure beta-cell toxicity and protection from autoimmune T-cell destruction *in vitro*, using a destabilized luciferase reporter gene, expressed under the human insulin promoter. A killing assay using PPI-directed CTLs as previously described, demonstrated that the luciferase assay was not affected by the quality of the isolated islet fraction. This approach facilitates the creation of a screening platform for identification of new compounds that inhibit the interplay between beta-cells and autoreactive T-cells.

Aspects of immune therapy

Targeted immune therapies, such as anti-CD3 therapy, have shown encouraging results in intervention treatment of T1DM, especially in subgroups. A major safety concern in the use of any immune modulating agent in type 1 diabetes mellitus is how well the immune reaction towards pathogens patients have prior been exposed to (recall immunity) and desired tumour immunity are preserved. In the successful European placebo-controlled Phase II Otelixizumab (humanized anti-CD3 antibody; ChAglyCD3) trial in recent onset T1DM patients the chosen antibody dosage was considerably higher than the dosage elected for the Phase III DEFEND1 and 2 studies, which did not reach its primary endpoint of preserved beta-cell function. The dosage had been reduced for safety reasons in light of temporary EBV reactivation. In **Chapter 6** we demonstrate in a subcohort of the European phase II Otelixizumab trial that proliferative responses towards common pathogens upon *in vitro* stimulation with different recall antigens were preserved in anti-CD3 treated patients and were highly similar to those in placebo-treated T1DM patients. We furthermore showed that T-cell responses towards auto-antigens were not significantly altered after high dose anti-CD3 therapy, which means we did not find evidence for reduced or enhanced and fuelled auto-immunity. The proliferative response upon stimulation with the human suppressor protein p53 was invariably high in both the anti-CD3 and the placebo-treated patients underlining preserved desired anti-tumour immunity in spite of anti-CD3 treatment. Although clinical endpoints were not met in subsequent Otelixizumab studies testing a much lower dose, it seems premature to disqualify anti-CD3 antibodies as potential therapy in recent onset T1DM. We demonstrated in this subcohort of recent onset T1DM patients treated with Otelixizumab, that recall immunity is preserved in spite of high-dose anti-CD3 treatment, adding to the safety of high dose anti-CD3 treatment as an immune modulatory agent in the treatment of T1DM.

Epicrise

As most PhD students, I started my journey as the “quest for the Holy Grail”. At the near finish of this thesis I wonder if there is *one* Holy Grail in T1DM research. I contend that an immune intervention can be successful, but in order for a patient to become insulin independent, beta-cell destruction and restoration of beta-cell function need to be addressed simultaneously. Likewise, there will be no successful beta-cell replacement therapy without the necessary immune protection. Furthermore, there is a need to address safety concerns in the development of any immune therapy, while at the same time one has to be aware of the health risks of diabetes itself with current (often suboptimal) insulin treatment regimes. These quests all interconnect just as the projects in this thesis interconnect.

In this thesis, in close collaboration with my research colleagues, I have shown that T-cell recruitment in both spontaneous autoimmune diabetes and islet transplantation requires presence of a cognate antigen, which could be used as an argument in favour of further pursuing antigen-specific therapies. We have shown that recurrent diabetes in an islet transplantation model is driven by memory autoreactive T-cells and this latter finding has contributed to the present testing of immune suppressive drugs that indeed address recurrent autoimmunity, to improve outcome in clinical islet transplantation. We have designed and tested a novel auto-immune diabetes cell lineage tracing model for future testing of the regenerative capacity of islet-cells. We have furthermore shown that immune evasion protects beta-cells from autoimmune T-cell attack *in vivo*. Currently different immune evasion techniques, such as islet encapsulation are being tested in the clinic. And we have shown that recall immunity is preserved in spite of high dose anti-CD3 treatment, adding to the safety of high dose anti-CD3 treatment as an immune modulator agent in the treatment of T1DM.

As said, I wonder if there is one Holy Grail in T1DM research. The combined Holy Grail in T1DM research in my opinion can be summarized as: the necessity to halt or elude the immune attack in T1DM in a safe manner, while simultaneously restoring beta-cell function.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Diabetes mellitus type 1 (T1DM) is een chronische ziekte die veroorzaakt wordt doordat het immuun systeem, dat geprogrammeerd is om ons te beschermen tegen aanvallen van buitenaf, de eigen insuline producerende bètacellen in de eilandjes van Langerhans in de alvleesklier bij vergissing vernietigt. Dit proces wordt *auto*-immuuniteit genoemd. Op dit moment bestaat er geen genezing voor T1DM: de behandeling bestaat uit frequente toediening van het hormoon insuline om de bètacelfunctie na te bootsen. Ondanks intensieve insuline behandeling, lukt het slechts bij een klein gedeelte van de T1DM patiënten om de bloedsuikers voldoende stabiel te houden. Het grootste gedeelte van de patiënten ontwikkelt complicaties aan ogen, nieren, lange zenuwbanen, hart en grote bloedvaten. Hierdoor draagt T1DM, ondanks insuline behandeling, nog steeds bij aan een hoge ziektelast, vermindering van kwaliteit van leven en een kortere levensverwachting.

De laatste decennia is veel kennis beschikbaar gekomen over het ontstaan van T1DM en mogelijke aanknopingspunten voor behandeling. Er zijn echter nog steeds veel vragen onbeantwoord. Het is bekend dat specifieke cellen van het afweersysteem, de zogenaamde CD8+ T-cellen, bètacellen herkennen en aanvallen, maar het is niet volledig bekend *waardoor* T cellen naar alvleesklier migreren om daar vervolgens bètacellen te vernietigen. Specifiek is het de vraag of het antigen of doelwit waartegen T-cellen reageren, noodzakelijkerwijs aanwezig moet zijn voor T-cel rekrutering. Het eerste deel van deze thesis richt zich op onderzoek naar bètacel vernietiging ofwel bètacel destructie. Diabetes kan *in muizen* genezen worden. Dit betekent dat het eerdere tekort aan insuline wordt opgeheven en dat er weer voldoende insuline geproduceerd wordt. Maar het is onduidelijk waar nieuwe insuline producerende cellen vandaan komen. Kunnen aangeslagen of uitgeputte bètacellen herstellen als ze niet meer worden aangevallen en/ of overvraagd worden? Delen reeds bestaande bètacellen zich? Worden nieuwe bètacellen gevormd uit voorloper- of stamcellen? Ook de invloed van het auto-immuun systeem op dit proces is onvoldoende bekend. Het tweede deel van deze thesis richt zich op bètacel herstel ofwel bètacel regeneratie. Klinische eilandjes transplantatie is een geaccepteerde behandeling in een zeer kleine subgroep van T1DM patiënten. Het succes hiervan wordt onder andere beïnvloed door T-cellen die naar het transplantaat migreren om de (getransplanteerde) bètacellen aan te vallen. Maar wederom is het onvoldoende bekend *waardoor* T-cellen naar de (getransplanteerde) bètacellen migreren. Omdat getransplanteerde eilandjes meestal afkomstig zijn van een donor met een andere genetische achtergrond dan de ontvanger, zal een ontvanger een afstotingsreactie ontwikkelen, zogenaamde *allo*-immuuniteit. Patiënten worden zo veel mogelijk tegen dit proces beschermd via afweer onderdrukkende medicijnen. Een nadeel is dat deze medicijnen zelf vaak een negatief effect op bètacellen hebben. Naast allo-immuuniteit is er een groeiende aandacht voor de rol van *auto*-immuuniteit in eilandjes transplantatie. T-cellen die tijdens het T1DM ziekteproces eigen bètacellen aanvallen, blijven vervolgens in het lichaam aanwezig

als memory of geheugen cellen die in staat blijven getransplanteerde eilandjes te herkennen en aan te vallen. Het is bekend dat T-cellen bètacel antigenen of doelwitten herkennen, een proces dat in T1DM uiteindelijk leidt tot bètacel destructie. Het is de vraag of bètacellen beschermd kunnen worden door deze processen van antigen presentatie en bètacel destructie gelijktijdig te beïnvloeden. Hiermee proberen we feitelijk bètacellen te camoufleren en het immuunsysteem om de tuin kunnen leiden. Specifiek is het de vraag of getransplanteerde eilandjes hierdoor beschermd kunnen worden. Het derde deel van deze thesis richt zich op verschillende aspecten van bètacel transplantatie ofwel bètacel vervanging. Klinisch onderzoek richt zich veelal op patiënten die net gediagnostiseerd zijn met T1DM. Een genezing voor T1DM is er op dit moment nog niet maar er zijn wel verschillende studies die laten zien dat het ziekteproces vertraagd kan worden. Gerichte immuuntherapieën, zoals Otelixizumab ofwel anti-CD3 therapie, hebben bemoedigende resultaten laten zien in de behandeling van T1DM, in het bijzonder in subgroepen van patiënten. Dit medicijn grijpt breder in op het afweersysteem dan alleen op het T1DM ziekteproces. Het is niet bekend wat het effect van deze therapie is ten aanzien van behoud van *gewenste* afweerreacties zoals tegen infecties en kanker. Het vierde en laatste deel van deze thesis richt zich op aspecten van immuun interventie.

Een veelgebruikt muismodel in T1DM onderzoek is de non-obese diabetes (NOD) muis. Deze muis ontwikkelt spontaan een auto-immuun vorm van diabetes en vertoont genetische en immunologische overeenkomsten met T1DM in patiënten. Naast overeenkomsten, zijn er grote verschillen tussen muizen en mensen, wat voorzichtigheid in het vertalen van resultaten gebied. Er is echter beperkte toegang tot de alvleesklier van patiënten tijdens het T1DM ziekteproces. Daarnaast is er een beperkte beschikbaarheid van betrouwbare biomarkers van zowel het beloop van het T1DM ziekteproces als van aspecten van interventie zoals effect en veiligheid. Daarom wordt in een groot aantal studies gebruikt gemaakt van diermodellen.

Bètacel destructie

Het is bekend dat T-cellen bètacellen herkennen en aanvallen. De omstandigheden die nodig zijn voor het rekruteren van T-cellen naar de alvleesklier zijn niet volledig bekend. Klinische autopsie studies van recent gediagnostiseerde T1DM patiënten wijzen overtuigend op de aanwezigheid van T-cellen in de alvleesklier die heel specifiek een auto-immuun antigen of doelwit herkennen. Met andere woorden, deze studies wijzen erop dat T-cel rekrutering een *antigen*-specifiek proces is. Echter, studies in verschillende infectie- en auto-immuun ziekte modellen suggereren dat T-cellen ook op *niet-antigeen*-specifieke wijze gerekruteerd kunnen worden en bijvoorbeeld aangetrokken worden door chemische stoffen die vrijkomen tijdens het onstekingsproces.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we de rekrutering van T-cellen, specifiek voor het veelvoorkomende en bij de ontwikkeling van diabetes betrokken epitoom of doelwit *islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein* (IGRP)²⁰⁶⁻²¹⁴.

We volgden de rekrutering van deze specifieke T-cellen naar de eilandjes van zowel gewone (wildtype) NOD muizen, als naar de eilandjes van genetisch gemodificeerde NOD muizen die een "onzichtbaar" IGRP doelwit tot expressie brengen. Hiermee testten we of T-cellen, die specifiek tegen het doelwit IGRP reageren ook tijdens het auto-immuun diabetes ziekteproces naar de alvleesklier worden gerekruteerd, als dit doelwit onzichtbaar voor hen is. Of anders gezegd, we testten of aanwezigheid van dit doelwit noodzakelijk is voor rekrutering van deze T-cellen naar de eilandjes van Langerhans. Muizen met gemodificeerd en dus onherkenbaar eilandjes-doelwit IGRP ontwikkelden even snel en even vaak auto-immuun diabetes als wildtype NOD muizen. In tegenstelling tot in wildtype NOD muizen echter, vonden we in de eilandjes van deze onherkenbaar IGRP doelwit muizen geen IGRP specifieke T-cellen. Aanvullende studies lieten zien dat rekrutering van zowel naïeve als van geactiveerde IGRP specifieke T-cellen naar de onherkenbare IGRP doelwit-eilandjes van deze muizen sterk verstoord was.

Deze resultaten laten zien dat lokale expressie van een specifiek antigeen wel degelijk een voorwaarde is voor de migratie van specifieke T-cellen naar de eilandjes van Langerhans. Onze resultaten laten ook zien, dat het simpelweg camoufleren van één specifiek antigeen het T1DM ziekteproces niet zal beïnvloeden. We zien namelijk in de onherkenbare IGRP doelwit-eilandjes een toename van specifieke T-cellen, gericht tegen een ander doelwit. Echter, het opwekken van tolerantie van T-cellen tegen een specifiek bètacel doelwit zou mogelijk wel het ziekteproces kunnen beïnvloeden en hier is verder onderzoek naar nodig. Rationale hierachter is dat het reguleren van één specifieke aanval zou leiden tot ook het reguleren van aanvallen tegen andere bètacel doelwitten. Het belang van aanwezigheid van een antigeen benadrukt bovendien het belang van memory of geheugencellen. Deze cellen kunnen hun specifieke antigenen te allen tijde opnieuw herkennen en aanvallen. Strategieën die aangrijpen op memory of die aangrijpen op (re)migratie naar eilandjes van Langerhans zijn de moeite van het exploreren waard. Inzicht in het complexe proces van T-cel rekrutering naar eilandjes van Langerhans tijdens het T1DM ziekteproces zou ons een stap dichterbij een interventie kunnen brengen. Specifiek zouden onze bevindingen een argument kunnen zijn voor het verder ontwikkelen van antigeen-specifieke therapieën.

Bètacel regeneratie

Bij het stellen van de diagnose T1DM is naar schatting reeds de meerderheid van de bètacellen vernietigd. Een van de hoofdthema's in T1DM onderzoek, is het vinden van een manier om deze bètacelmasse en -functie te herstellen. Er zijn therapieën beschikbaar voor T1DM patiënten die het ziekteproces vertragen. In muizen zijn er therapieën beschikbaar die leiden tot volledige genezing van auto-immuun diabetes. De beschikbaarheid van deze therapieën leidt tot de vraag hoe de functionele bètacelmasse (tijdelijk) kan herstellen na succesvolle (immuun) interventie. Bovendien draagt het wereldwijde tekort aan alvleesklier donoren voor transplantatie als alternatief voor herstel van bètacelmasse en -functie bij aan de noodzaak van studies naar de regeneratieve of herstel capaciteit van de alvleesklier.

Veronderstelde mechanismen achter bètacel regeneratie zijn replicatie (het delen van reeds bestaande bètacellen), neogenese (nieuwvorming van bètacellen vanuit stamcellen of vanuit andere (alvleesklier) cellen) en herstel van uitgeputte bètacellen. Het blijft echter moeilijk de ware oorsprong van nieuwe insuline producerende cellen in preklinische modellen te herleiden.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we de ontwikkeling van zogenaamde celherkomst traceer modellen in NOD muizen. Deze techniek baseert zich op het blijvend en erfelijk overdraagbaar labelen van individuele eilandjes cellen. Deze genetisch gemodificeerde muizen brengen een Rood Fluorescerend Proteïne (RFP) tot expressie in ofwel hun bètacellen ofwel hun alfacellen, wat de cellen traceerbaar maakt. Alfacellen bevinden zich ook in de eilandjes van Langerhans, zij produceren het hormoon glucagon. Glucagon is een soort tegenhormoon van insuline, dat beschermd tegen een te lage bloedsuiker. Alfacellen worden onder andere genoemd als mogelijke oorsprong voor bètacel regeneratie. We testten drie modellen, twee met RFP gelabelde bètacellen en één met RFP gelabelde alfacellen. De RFP labeling van bètacellen in onze eerste twee modellen was intens, cel type specifiek en bereikte labelings percentages van meer dan 90%. Expressie van RFP in alfacellen ons derde model was iets lager (circa 60%).

Wat nieuw is aan onze modellen is het feit dat deze muizen spontaan een auto-immuun vorm van diabetes ontwikkelen vanwege hun NOD achtergrond. Tot nu toe zijn bètacel regeneratie studies uitgevoerd in celherkomst traceermodellen zonder auto-immuun achtergrond, wat mogelijk effect heeft op de uitkomst. Onze modellen zouden gebruikt kunnen worden om de origine van insuline producerende cellen na succesvolle immuun interventie in preklinische studies te achterhalen. Bovendien kunnen deze modellen inzicht geven in de rol van aanhoudende auto-immuniteit op bètacel regeneratie. Voorzichtigheid is geboden in de klinische translatie van bevindingen uit muismodel studies, vanwege de mogelijke verschillen in regeneratie en regeneratief vermogen tussen muizen en mensen. Maar met model limitaties in het achterhoofd, zouden celherkomst traceer studies ons kunnen helpen ten aanzien van welke regeneratieve mogelijkheden verder onderzocht zouden kunnen worden. Mits relevant voor de mens, zou het identificeren van regeneratieve mogelijkheden kunnen leiden tot het ontwikkelen van strategieën die het effect van succesvolle immuun therapieën versterken.

Bètacel vervanging

Eilandjes transplantatie is een geaccepteerde therapie voor patiënten met complete insuline deficiëntie, die niet goed te reguleren zijn en die bij herhaling levensbedreigende lage bloedsuikers hebben. Klinische eilandjes transplantatie kent echter nog vele uitdagingen.

Er is toenemend aandacht voor de invloed van auto-immuniteit op het effect van eilandjes transplantatie. In **Hoofdstuk 4** testten we of T-cel rekrutering in een eilandjes transplantatie model vergelijkbaar is met T-cel rekrutering naar eigen eilandjes zoals beschreven in hoofdstuk 2. We monitorde de rekrutering van dezelfde specifieke IGRP T-cellen naar

getransplanteerde eilandjes die ofwel herkenbaar ofwel onherkenbaar IGRP doelwit tot expressie brengen. Deze eilandjes werden getransplanteerd in ofwel diabetische wildtype NOD ontvangers ofwel in diabetische NOD ontvangers met genetisch gemodificeerd en dus onherkenbaar IGRP doelwit. Er waren dus in totaal vier donor-ontvanger combinaties. Wildtype NOD ontvangers bezitten zowel naïeve als memory IGRP specifieke T-cellen omdat deze reeds voor transplantatie, tijdens de ontwikkeling van diabetes, het IGRP doelwit zijn tegengekomen. Ontvangers met onherkenbaar IGRP doelwit bezitten alleen naïeve IGRP specifieke T-cellen, aangezien deze nooit eerder hun IGRP doelwit zijn tegengekomen. Alle getransplanteerde muizen ontwikkelden binnen twee weken opnieuw diabetes. Dit laat zien dat de ontspoorde afweerreactie tegen IGRP wel een rol speelt in maar niet noodzakelijk is voor transplantaat falen in NOD muizen met diabetes. Wildtype NOD ontvangers rekruteerden IGRP specifieke T-cellen naar transplantaten met herkenbaar IGRP doelwit, maar niet naar transplantaten met onherkenbaar IGRP doelwit. In onherkenbaar IGRP doelwit NOD ontvangers werd geen rekrutering van IGRP specifieke T-cellen gezien, onafhankelijk van de donor. We laten hiermee zien dat afwezigheid van een autoantigen of doelwit in eilandjes van Langerhans, de transplantaten 'onzichtbaar' maakt voor de memory (en naïeve) T-cellen die geprogrammeerd zijn om dit doelwit te herkennen. Deze resultaten laten zien dat lokale expressie van een specifiek antigeen een voorwaarde is voor de migratie van specifieke T-cellen naar getransplanteerde eilandjes van Langerhans. Eerder hebben we in hoofdstuk 2 laten zien dat dit ook het geval is voor T cel rekrutering naar de eigen eilandjes. Doelwit IGRP afkomstig uit het transplantaat was in staat om naïeve IGRP specifieke T-cellen te activeren, maar transplantaat destructie door memory T-cellen trad sneller op dan rekrutering van nieuw geactiveerde cellen. In dit model kijken we niet naar allo-immuniteit, de immuunreactie tegen weefsel van donoren met een andere genetische achtergrond dan de ontvanger. Hoewel dit bij klinische eilandjes transplantatie wel degelijk een belangrijke rol speelt, kijken we in ons model specifiek naar auto-immuniteit in transplantatie. Onze resultaten wijzen erop dat auto-immuniteit in afwezigheid van allo-immuniteit gedreven wordt door T-cellen die geactiveerd zijn tijdens de oorspronkelijke immuun reactie, de zogenaamde memory T-cellen. Onze bevindingen benadrukken het belang van het ontwikkelen van immuun strategieën die zich richten op deze auto reactieve memory T-cellen na bètacel vervangende therapie en hebben mogelijk ook invloed op de selectie en behandeling van T1DM kandidaten voor eilandjes transplantatie. Studies naar klinische eilandjes transplantatie vanuit onze onderzoeksgroep hebben eerder laten zien dat reactivatie van memory autoreactieve T-cellen een enorm obstakel is voor het bereiken ofwel behouden van insuline-onafhankelijkheid in getransplanteerde T1DM patiënten. Dit impliceert dat de huidige immuun suppressieve strategieën niet voldoende aangrijpen op auto-immuun memory en wijst op de noodzaak van het ontwikkelen van nieuwe immuunsuppressieve therapieën die zich richten op memory T-cellen. Ons preklinische model zou gebruikt kunnen worden om validatie studies op dit gebied te verrichten.

Transplantatie van genetisch gemodificeerde en feitelijk gecamoufleerde eilandjes zou een manier kunnen zijn om bescherming te bieden tegen auto-immuniteit. Dit zou

mogelijk het klinisch effect van eilandjes transplantatie kunnen verbeteren. In **Hoofdstuk 5** testten we of beïnvloeding van immuun herkenning door verminderde MHC-I expressie (een molecuul dat noodzakelijk is voor de presentatie van bètacel doelwit aan (CD8+) T-cellen) gecombineerd met remming van de cytotoxische granzyme B activiteit (een enzym dat een belangrijke rol speelt in de daadwerkelijke destructie van bètacellen) humane bètacellen beschermt tegen de invloed van auto-immuniteit. We hebben laten zien dat eilandjes cellen, losgeweekt uit de eilandjes, met behulp van lentivirale vectoren efficiënt genetisch gemodificeerd kunnen worden en vervolgens hergroepeerden tot pseudo-eilandjes. Deze humane pseudo-eilandjes bleken histologisch en functioneel vergelijkbaar met niet gemodificeerde eilandjes. Zij bleken echter beter beschermd tegen een auto-immuun aanval door specifieke T-cellen getraind om bètacellen aan te vallen, dan niet gemodificeerde eilandjes. De T-cellen waarmee we dit testten zijn afkomstig van een patiënt met recent gediagnosticeerde T1DM. Ook wanneer deze humane pseudo-eilandjes samen met de specifieke T-cellen onder het nierkapsel van immuun gecompromiteerde muizen werden getransplanteerd, behielden deze eilandjes hun natuurlijk vermogen tot afgifte van insuline in tegenstelling tot onbeschermd eilandjes. Dit preklinische gehumaniseerde muismodel biedt mogelijkheden om het lot van bètacellen in een ontstekingsomgeving te testen. Onze bevindingen wijzen erop dat beïnvloeding van immuun herkenning met behulp van lentivirale vectoren, ofwel immuun-evasie, de kwaliteit van eilandjes niet negatief beïnvloedt en dat het beta cellen beschermt tegen auto-immuniteit.

Om immuun protectie te toetsen zijn betrouwbare metingen van bètacel toxiciteit ofwel bètacel destructie noodzakelijk. Deze metingen worden echter beïnvloed door de kwaliteit van de geïsoleerde eilandjes fractie, die naast bètacellen bestaat uit andere celtypen zoals alfacellen, duct cellen en endotheel cellen. In **Hoofdstuk 5** beschrijven we een strategie om selectief bètacel toxiciteit en de bescherming tegen autoimmuun T-cel destructie te meten. Deze assay zou gebruikt kunnen worden als screeningsplatform om de effectiviteit en toxiciteit van nieuwe interventie strategieën in T1DM te testen.

Aspecten van immunotherapie

Gerichte immuuntherapieën, zoals Otelixizumab ofwel anti-CD3 therapie, hebben bemoedigende resultaten laten zien in de behandeling van T1DM, in het bijzonder in subgroepen van patiënten. Een belangrijke aspect ten aanzien van veiligheid in de toepassing van welk immuun modulerende therapie dan ook in T1DM is de mate van behoud van gewenste afweerreacties, zoals tegen infecties en kanker.

In **Hoofdstuk 6** testten we in een deel van de patiënten die deelnamen aan de Europese Fase II studie met Otelixizumab de immuunreactie tegen veelvoorkomende ziekteverwekkers (bacterie, virus en gist). We laten zien dat deze immuunreacties in tact zijn gebleven in anti-CD3 behandelde patiënten en dat deze vergelijkbaar zijn met immuunreacties bij met placebo behandelde T1DM patiënten. We tonen verder aan dat immuunreacties tegen bètacel doelwit niet anders was na hoge dosis anti-CD3 therapie

en dat hiermee geen aanwijzingen gevonden werden voor verhoogde auto-immuniteit, het ziekteproces bij T1DM. De immuunreactie tegen tumoreiwit was onveranderlijk hoog in zowel de anti-CD3 behandelde als de placebo controle groep, wat het wenselijk behoud van anti-tumor immuniteit benadrukt. Hoewel het doel van diabetesinterventie niet behaald werd in vervolgstudies met veel lagere dosis Otelixizumab (om reactivatie van Epstein-Barr virus te voorkomen), lijkt het voorbarig om anti-CD3 te diskwalificeren als potentiële therapie in recent gediagnostieerde T1DM patiënten. In dit subcohort van recent gediagnostieerde patiënten met T1DM behandeld met Otelixizumab laten we zien dat de gewenste afweerreactie tegen infecties en kanker intact blijft ondanks hoge dosis anti-CD3 behandeling. Deze bevindingen benadrukken de veiligheid van hoge dosis anti-CD3 als immuun modulator in de behandeling van T1DM.

Epicrise

Zoals de meeste promovendi, begon ik dit T1DM onderzoekstraject als 'de zoektocht naar de heilige graal'. Nu mijn thesis bijna af is, vraag ik me af of er één heilige graal bestaat binnen het T1DM onderzoek. Een immuun interventie kan succesvol zijn, maar zonder aandacht te schenken aan bètacel destructie en herstel van bètacel functie, zal een patiënt in de meeste gevallen afhankelijk blijven van insuline-injecties. Bètacel vervangende therapie kan alleen succesvol zijn met behulp van geschikte immuun protectie, anders zullen de getransplanteerde bètacellen opnieuw vernietigd worden. En het ontwikkelen van een immuun therapie brengt automatisch aandacht voor veiligheidsaspecten met zich mee, waarbij men zich wel moet realiseren dat het simpelweg hebben van T1DM met de huidige (suboptimale) insuline regimes, ook gezondheidsrisico's met zich mee brengt. Deze zoektochten zijn allemaal met elkaar verbonden, net zoals de projecten binnen mijn thesis met elkaar verbonden zijn.

In deze thesis heb ik, in nauwe samenwerking met mijn collega-onderzoekers, laten zien dat lokale expressie van een antigeen een voorwaarde is voor de migratie van specifieke T-cellen naar de eilandjes van Langerhans, zowel tijdens het T1DM ziekteproces, als na eilandjes transplantatie. Dit zou een argument kunnen zijn voor het verder ontwikkelen van antigeen-specifieke therapieën. We hebben in een transplantatiemodel ook laten zien dat auto-immuniteit in afwezigheid van allo-immuniteit gedreven wordt door T-cellen die geactiveerd zijn tijdens de oorspronkelijke immuun reactie, de zogenaamde memory T-cellen. Deze bevindingen hebben bijgedragen aan onderzoek dat op dit moment verricht wordt naar het effect van verschillende immuun strategieën op allo- en auto immuniteit, ter verbetering van de transplantaatfunctie. We hebben een nieuw auto-immuun celherkomst traceer model ontwikkeld en getest, wat gebruikt zou kunnen worden in onderzoek naar het regeneratieve vermogen van eilandjes cellen. We hebben verder laten zien dat immuun-evasie bètacellen tegen een aanval van auto-immuun T-cellen beschermt en op dit moment worden verschillende immune-evasie technieken klinisch getest. We hebben tot slot laten zien dat gewenste immuunreacties in tact zijn gebleven in anti-CD3 behandelde patiënten, informatie die bij draagt aan de veiligheid van hoge dosis anti-CD3 in de behandeling van T1DM.

Zoals gezegd, vraag ik me af of er één heilige graal bestaat binnen het T1DM onderzoek. De gecombineerde heilige graal in T1DM onderzoek is mijns inziens samen te vatten in de noodzaak om de immuun aanval in T1DM op een veilige manier te stoppen of af te leiden, met gelijktijdig aandacht voor herstel van bètacel functie.

ACKNOWLEDGEMENT / DANKWOORD

Eind 2008 begon ik vanuit het Leids Universitair Medisch Centrum aan de uitdaging promotieonderzoek. Vijf verhuizingen binnen drie landen, drie prachtige kinderen en een afgeronde opleiding internist-endocrinoloog later ligt hier het resultaat: een samenvatting van mijn onderzoeksprojecten uitgevoerd in Leiden en in Calgary.

Beste professor Roep, beste Bart, hartelijk dank voor het feit dat je onmiddellijk mijn enthousiasme deelde, voor al je inzet om dit promotietraject mogelijk te maken en voor je voortdurende begeleiding. Super dat je ons bent komen opzoeken in Canada en ik ben er trots op dat we vandaag dit gezamenlijke project afronden. Dear Professor Santamaria, dear Pere, thank you for welcoming me in your lab where I have learned so much. And thank you for making us feel at home in Calgary.

A big thank you to my Canadian colleagues, especially to Sue, Xavi, Afshin, Jinguo, Bao-You and Jun, who taught me everything I needed to know in the lab. I really enjoyed working with you all and I wish you could be here today. Beste IHB/ Roep-groep en in het bijzonder beste Tanja, promotiecommissielid, beste Arnaud, Joana, Cornelis, Martijn, Arno, Menno, Sandra, Antoinette, Fleur, Gaby en Melissa, dank voor jullie support en gezelligheid. Ook bedank ik graag professor Keymeulen en Ursule, en voorts Bobby Koelman en Ruben voor de prettige samenwerking.

Hartelijk dank aan het Diabetesfonds voor het steunen en mogelijk maken van dit onderzoekstraject.

Beste professor Wolffenbuttel, beste Bruce, promotiecommissielid, je hebt van het begin af aan mijn interesse gewekt in aangeboren stofwisselingsziekten. Dank voor de leerzame opleidingstijd in het UMCG, en onze fijne samenwerking. Beste professor De Koning, beste Eelco, promotiecommissielid, dank voor het feit dat je voortdurend interesse hebt getoond in mijn promotieonderzoek. Ook bedank ik graag de overige leden van de promotiecommissie: professor Max Nieuwdorp en professor Jaapjan Zwaginga.

Beste professor Romijn, beste Hans, dank voor je meedenken in de aanloop naar dit traject. Je hebt me erg geholpen de internationale mogelijkheden te zien op gebied van onderzoek en kliniek.

Dank aan Tom van Raaij en Ignaz Worm, beiden ervaringsdeskundige, voor hun motiverende woorden tijdens periodes van enige vertwijfeling.

Er zijn drie personen waarvan ik had gewild dat ze er vandaag bij konden zijn. Professor Pieter de Mulder, jij hebt mijn interesse gewekt in zowel interne geneeskunde als in onderzoek, dank hiervoor. Dr. Rob Valentijn, ik heb zo veel van je geleerd, niet alleen op het gebied van interne geneeskunde, maar ook op de piste! Reza Karami Djurabi, collega van het eerste uur, wat had jij het verdiend hier vandaag zelf te staan.

Lieve familie: lieve ouders, Willem, Lilith, Seppe, Elin en Netty, dank voor jullie onvoorwaardelijke steun, vertrouwen en gezelligheid. Lieve Anna, zus en paranimf, dank voor al je wijze raad en je hart van goud. Lieve Hannah, collega en paranimf, dank voor de onvergetelijke opleidingstijd aan Het Hoogste Adres. Dames van Aglaia: Minke, Maaïke, Simone, Mariola en Ingrid, mijn ultieme klankbord. Ik ben zo blij met jullie vriendschap.

Lieve Charles, dank voor je steun, je relativiseringsvermogen en je liefde. Dit project is verworven met ons Canada avontuur, wat ons zoveel moois heeft gebracht. Ik zou het ieder moment over doen! Lieve Kiki, Folef en Noor, mama's boek is eindelijk af en ja, nu geven we een feest! Jullie zijn de zonnestralen in mijn leven.

En tot slot dank aan Jessye Norman, die mij tijdens mijn schrijfwerk immer bemoedigend is blijven toezingen.

PUBLICATIONS GONNIE ALKEMADE

1. *Wolfraim LA, Alkemade GM, Alex B, Sharpe S, Parks WT, Letterio JJ*: Development and application of fully functional epitope-tagged forms of transforming growth factor- β . *Journal of Immunological Methods* 2002;266:7-18
2. *Alkemade GM, Willems JM*: Polycytemia Vera presenting as sudden onset cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society* 2008;56:2362-2363
3. *Wang J, Tsai S, Shameli A, Yamanouchi J, Alkemade G, Santamaria P*: In situ recognition of autoantigen as an essential gatekeeper in autoimmune CD8+ T cell inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:9317-9322
4. *Alkemade GM, Hilbrands R, Vandemeulebroucke E, Pipeleers D, Waldmann H, Mathieu C, Keymeulen B, Roep BO*: Preservation of recall immunity in anti-CD3-treated recent onset type 1 diabetes patients. *Diabetes/ Metabolism Research and Reviews* 2011;8:925-927
5. *Alkemade GM, Clemente-Casares X, Yu Z, Xu BY, Wang J, Tsai S, Wright JR Jr, Roep BO, Santamaria P*: Local autoantigen expression as essential gatekeeper of memory T-cell recruitment to islet grafts in diabetic hosts. *Diabetes* 2013;62:905-11
6. *Zaldumbide A, Alkemade GM, Carlotti F, Nikolic T, de Abreu J, Engelse M, Skowera A, de Koning EJ, Peakman M, Roep BO, Hoeben RC, Wiertz E*: Genetically engineered human islets protected from CD8 mediated autoimmune destruction *in vivo*. *Molecular Therapy* 2013;21:1592-1601
7. *Alkemade GM, Bakker M, Rikhof B, IJpma FFA, Van Ginkel RJ, Kluin PM, Van Doorn J, Dullaart RPF*: Hypoglycemia in a patient with a big "big"-IGF-II producing tumor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013;87:3113-3114
8. *De Kruijf EJFM, Alkemade GM, Van Os R, Fibbe WE, Van Pel M*: Peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cell frequency is unchanged in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency. *International Journal of Hematology*, 2014;99:714-720
9. *Brouwers MC, Linthorst GE, Karstens FP, Rennings A, Alkemade G, Meersseman W, Cassiman D, Thijs A, Wolffenbuttel BH, Hollak CE, Janssen MC, Langendonk J*: Adults with an inherited metabolic disorder: a rapidly growing population with unique challenges. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 2014;158:A7745.

CURRICULUM VITAE

Gonnie Alkemade was born March 13th 1977 in Amersfoort, the Netherlands. She attended secondary school at 'Het Nieuwe Eemland College' in Amersfoort, the Netherlands and passed her gymnasium exam in 1995. From 1995-1996 she studied Medicine at the University of Leuven, Belgium. From 1996-1997 she studied Biomedical Health Sciences at the Radboud University of Nijmegen, the Netherlands. She subsequently started her Medicine study at this university, during which she spent 6 months at the National Institutes of Health in Bethesda, U.S.A. (Principle Investigator dr. J.J. Letterio, Laboratory of Cell Regulation and Carcinogenesis, supervisor prof. dr. P.H.M. De Mulder, Radboud University of Nijmegen). In 2003 she obtained her medical degree. After 18 months as resident Internal Medicine (ANIOS) at former 'Rode Kruis Ziekenhuis', the Hague, the Netherlands (currently Haga Ziekenhuis) she started her formal Internal Medicine training (AIOS) at this hospital in 2005 (Head of Department: dr. R.M. Valentijn) and subsequently at Leiden University Medical Center, the Netherlands (Head of Department: prof. dr. J.A. Romijn). In 2008 she started her Ph.D. as a collaboration between Leiden University Medical Center, the Netherlands (prof. dr. B.O. Roep, Department of Immune haematology en Blood Transfusion) and the University of Calgary, Canada (prof. dr. P. Santamaria, Julia McFarlane Diabetes Research Center and Department of Microbiology and Infectious Diseases). In 2012 she continued her Internal Medicine training as fellow Endocrinology at University Medical Center Groningen, the Netherlands (Head of Department: prof. dr. B.H.R. Wolffenbuttel). In December 2013 she registered as Internist-Endocrinologist and continued to work at the Endocrinology department of the University Medical Center Groningen. In January 2015 she and her family moved to Aberdeen, Scotland. In April 2015 she joined the Diabetes and Endocrinology Department of the Aberdeen Royal Infirmary, Scotland, U.K. (Head of Department: dr. P. Abraham).

