Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein

Modulation des experimentellen Typ-1 Diabetes durch Insulinantikörpertherapie – eine präklinische Pilotstudie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Meike Nele Schivelbein

Hamburg, Deutschland

2013

Amtierender Dekan : Prof. Dr. T. Wirth

1 Berichterstatter: Prof. Dr. B. Böhm

2 Berichterstatter: PD Dr. B. Manfras

Tag der Promotion: 12.12.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1 Diabetes mellitus Typ 1: Ätiologie und Pathogenese 2
1.2 Diabetes mellitus Typ 1: Epidemiologie 3
1.3 Insulin 4
1.4 Insulin als Antigen und Inselzellautoimmunität 4
1.5 T-Zellen 5
1.7 Antikörper 7
1.8 Sialinsäure 8
1.9 Tiermodelle bei Diabetes mellitus 8
1.10 Hypothese und Ziele 10
2. Materialien und Methodik 11
2.1 Tierexperimentelle Studien 12
2.2 DNA-Impfung 12
2.3 B22 und B22-Mimo 13
2.4 Experimentverlauf 14
2.5 Peptidstimulation der T-Zellen in der Milz 15
2.6 Peptidstimulation der T-Zellen im Pankreas 16
2.7 Tetramerfärbung 17
2.8 Durchflusszytometrieanalyse/FACS 18
2.9 Hämatoxilin-Eosin-Färbung der Pankreaspräparate 18
2.10 Immunfluoreszensfärbung des Pankreasgewebes 19
2.11 Datenanalyse 19
3. Ergebnisse 21
3.1 Inzidenzkurven 22
3.2 Graphische Darstellung der gemessenen Blutzuckerwerte 24
3.3 Ergebnisse des X^2-Test 25
3.4 Immunfluoreszenzhistologie 27
3.5 T-Zellanalyse der Peptidstimulation in der Milz mit B22 und B22-Mimo 28
3.6 FACS-Daten zur Peptidstimulation 31

3.7 Tetramerfärbung.....32
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse.....34
4. Diskussion.....35
4.1 Darstellung der eigenen Ergebnisse.....36
4.2 T-Zellanalyse, Peptidbindung und Tetramerbindung.....37
4.3 DNA- Immunisierung mit ppInsIIΔA12-21.....37
4.4 B22 Epitop und B22-Mimotop.....38
4.5 Therapieansatz mit Insulinantikörpern.....38
4.6 Präventive Antikörpergabe.....39
4.7 Dosierung des Antikörpers und Behandlungsdauer.....40
4.8 Antikörper und Sialinsäure.....41
4.9 Ausblick und Perspektiven.....43
5. Zusammenfassung.....45
6. Literaturverzeichnis.....47
Danksagung
Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

AK1:	Antikörper 1
AK0:	Antikörper 0
APC:	Antigenpräsentierende Zelle
APL:	Altered peptide ligand
BSA:	Bovine serum albumin
CD:	Cluster of differentation
cDNA:	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CTLA-4:	Cytotoxic t-lymphocyte antigen
DAPI:	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMT1:	Diabetes mellitus Typ 1
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EAD:	Experimenteller Autoimmundiabetes
FACS:	Fluorescence activated cell sorting
FCS:	Foetal calf serum
FSC:	Forward scatter
GAD-65:	Glutamat-Decarboxylase 65
HE:	Hämatoxilin-Eosin
HLA:	Human leukocyte antigen
IFN-γ:	Interferon-γ
IVIG:	Intravenöse Immunglobuline
kDa:	Kilo Dalton
MACS:	Magnetic-activated cell sorting
MHC:	Major histocompatibility complex
NOD:	Non-obese diabetic mouse
PBS:	Phosphate-buffered saline
PPINSII:	PräproinsulinII
OVA:	Ovalbumin
PE:	R-Phycoerthyrin
RIP:	Rat Insulin Promoter
RMPI-MEDIUM:	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RNA:	Ribonukleinsäure

RT-PCR:	Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion
SSC:	side scatter
TCR:	T-cell-receptor
TREG:	Regulatorische T-Zelle

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 1: Ätiologie und Pathogenese

Diabetes mellitus Typ 1 (DMT1) wird als Autoimmunerkrankung verstanden, bei der es zu einer T-Zell-vermittelten Zerstörung der Betazellen der Bauchspeicheldrüse (Insulitis) und nachfolgendem Insulinmangel kommt. Die Erkrankung wird durch ein Zusammenspiel von $CD4^+$- sowie $CD8^+$-T-Zellen vermittelt (Burster et Boehm 2010). Das Hauptaugenmerk liegt jedoch nach Daten der aktuellen Forschung auf den $CD8^+$-T-Zellen. Autoreaktive $CD8^+$-T-Zellen erkennen Peptidepitope, die auf der Betazelloberfläche exponiert und mit HLA-Klasse-1-Molekülen assoziiert sind (Roep 2008). DMT1 entsteht unter anderem als Folge einer von $CD8^+$-T-Zellen dominierten Immunantwort gegen Inselantigene. Dies führt zu einer Zerstörung der Betazellen (Tsai et al. 2008). Welche Rolle regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) spielen, ist noch nicht ganz geklärt. Man geht davon aus, dass die T-Effektorzellen gegenüber den Signalen der Treg-Zellen resistent werden (Buschard 2011).
Die Krankheit wird nach heutigem Forschungsstand durch ein Wechselspiel von genetischen Faktoren sowie Umweltfaktoren ausgelöst. Dazu existiert eine Vielzahl von Hypothesen. Teilweise wird davon ausgegangen, dass Infektionen mit Viren eine wichtige Rolle als Auslöser spielen (Hyoty et Taylor 2002). In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass die Betazellen einiger an DMT1 erkrankten Patienten mit dem Coxsackie-B4-Virus befallen waren (Dotta et al. 2007). Dieses Virus verursacht eine sogenannte „slow-virus-infection“ und persistiert lange in den Betazellen. Diese Persistenz könnte durch andauernde Stimulierung des erworbenen Immunsystems zur Betazellzerstörung führen. Eine weitere Möglichkeit die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu deuten, bietet die sogenannte „fertile field“-Hypothese (Boettler et van Herrath 2011). Diese besagt, dass dem Ausbruch von Autoimmunmechanismen vermutlich eine Entzündungsreaktion vorausgeht. Ein weiterer Ansatz um die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu verstehen, ist in der Hygiene-Hypothese formuliert (Strachan 1989). Diese besagt, kommen Autoimmunerkrankungen häufiger in „sterilen“ Umgebungen vor, da das angeborene System zu wenig gefordert wird.
Die pathologischen Vorgänge des DMT1 beginnen bereits lange vor Ausbruch der Krankheit. Die Erkrankung bricht erst aus, wenn ca. 80 % der Betazellen im Pankreas zerstört sind (Klinke 2008) und es infolge dessen zu einer insuffizienten Insulinsekretion kommt. Die Blutzuckerhomöostase kann nicht mehr aufrecht erhalten werden mit dem Leitsymptom der Hyperglykämie. Weitere Symptome sind Glucosurie, Polydipsie sowie Polyurie (Kerner et al. 2011).

Da DMT1 nicht nur zum Untergang des Inselzellapparates führt, sondern auch schwere Veränderungen in anderen Organsystemen auslösen kann, vornehmlich in der Niere (diabetische Nephropathie), im Auge (diabetische Retinopathie), am Nervensystem (diabetische Neuropathie) und infolge dessen an den Extremitäten (diabetisches Fußsyndrom), ist es wichtig, nach neuen Wegen zu suchen, die Progression dieser Krankheit zu verzögern oder den Ausbruch der Erkrankung sogar aufzuhalten.

1.2 Diabetes mellitus Typ 1: Epidemiologie

DMT1 ist die häufigste chronische Stoffwechselerkrankung im Kindesalter (Holterhus et al. 2009). Im Jahre 1985 waren weltweit 30 Millionen Menschen an Diabetes mellitus Typ 1 und 2 erkrankt, die Prognose für das Jahr 2030 liegt bei über 360 Millionen erkrankten Menschen (Jameson 2010). In Deutschland leiden ca. 8 % der Bevölkerung an Diabetes mellitus, davon wiederum 5-10 % an DMT1 (Giani et al. 2004). Die Inzidenz des DMT1 steigt am stärksten in der Altersgruppe von 0-4 Jahren an (Devendra et al 2004). Man geht davon aus, dass sich die Inzidenz des DMT1 in der Altersgruppe der Kinder unter fünf Jahren bis zum Jahre 2020 verdoppelt haben wird (Patterson et al. 2009). In Tabelle 1 sind die wichtigsten Unterschiede von Diabetes Typ 1 und Typ 2 zusammengefasst.

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2.

	Typ 1	Typ 2
Manifestation	Kinder und Jugendliche, selten Erwachsene	Erwachsene, in letzter Zeit vermehrt Jugendliche
Beginn	Plötzlich	Schleichend
Symptome	Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose	Häufig keine akuten Symptome
Insulinsekretion	Vermindert bis fehlend	Qualitativ gestört
Insulinresistenz	Keine- gering	Stark
HLA-Assoziation	Vorhanden, DR3/DR4	Keine
Antikörper	Bei Manifestation bis 95%	Keine
Behandlung	Insulintherapie	Lifestylemodifikation, OAD, b.B. Insulintherapie

(Tabelle nach Kerner et Brückel 2011)

1.3 Insulin

Das Hormon Insulin ist ein Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von 5,8 kDa. Die Herstellung von Insulin in der Betazelle erfolgt durch eine proteolytische Prozessierung. Dabei wird zunächst das aminoterminale Signalpeptid des Präproinsulins abgespalten und es entsteht Proinsulin. Dieses besteht aus einer aus 21 Aminosäuren bestehenden A-Kette, einer aus 30 Aminosäuren bestehenden B-Kette und dem C-Peptid. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Proinsulin wird durch proteolytische Spaltung im endoplasmatischen Retikulum unter Abspaltung des C-Peptids in die aktive Hormonform Insulin umgewandelt. Insulin ist ein anaboles Hormon, welches für die Glykolyse, Glykogensynthese, Lipogenese und Proteinsynthese verantwortlich ist.

1.4 Insulin als Antigen und Inselzellautoimmunität

In der Pathogenese des DMT1 wurden verschiedene Autoantigene wie GAD-65, Proinsulin und Insulin nachgewiesen. Diese Autoantigene werden von autoreaktiven T-Zellen erkannt. Wie es zu der Ausbildung von Autoantikörpern in der Entstehung bei DMT1 kommt, ist noch nicht vollständig verstanden. Es gibt die Hypothese, dass eine Antigen-getriggerte Antikörperproduktion auf Inselzellantigene stattfindet (Richter et al. 1995). Die Ausbildung der Antikörper beruht auf einem komplexen Zusammenspiel des Immunsystems, in dem B-Zellen, zuständig für die Antikörperproduktion, mit den autoreaktiven T-Zellen kooperieren. Eine andere Forschungsgruppe konnte einen Zusammenhang zwischen der Konfiguration der leichten und schweren Kette der variablen Region vier verschiedener IgG1-Antikörper und ihren Epitopen (Bindungsstellen) ermitteln (Madec et al. 1996). Alle vier Epitope hatten verschiedene Sequenzen, mit denen sie am Inselzellantigen GAD-65 binden konnten. Diese Variabilität könnte man auf eine gemeinsame Entwicklung aus der T-Zell-abhängigen Immunantwort zurückführen. Zur Entwicklung einer immunmodulatorischen Therapie ist es sehr wichtig Epitope autoreativer T-Zellen zu kennen, um mit ihrer Hilfe „altered peptide ligands“ (APL) herzustellen. APLs sind Peptidanaloga dieser Epitope, die an MHC-Moleküle binden und die T-Zellaktivität auf verschiedene Weise verändern können, durch Antagonismus (Proliferationsinhibierung), Anergievermittlung (T-Zellen werden nicht kloniert) oder durch Agonismus, d.h. eine T-Helferzelle wird zu einer regulatorischen T-Zelle (Burster et Boehm 2010).

1.5 T-Zellen

DMT1 ist eine T-Zell- vermittelte Autoimmunerkranung, bei welcher ein Fokus auf den zytotoxischen $CD8^+$-T-Zellen liegt (Willcox 2008). T-Zellen sind Lymphozyten, die im Thymus reifen und einen Teil der adaptiven Immunantwort bilden. Zytotoxische T-Zellen tragen CD8 als Oberflächenmarker und binden spezifisch an MHC-Klasse-I-Moleküle. Zur Aktivierung müssen zytotoxische T-Zellen mindestens zwei Aktivierungssignale erhalten. Es muss ein Peptidfragment des Antigens von einer APC präsentiert werden und mit dem T-Zell-Rezeptor über CD28, einem co-stimulatorischen Rezeptor, einen Komplex bilden (Alegre et al. 2001). Die aktivierte Zelle ist in der Lage Zytotoxine und Zytokine zu produzieren, um das Antigen zu eliminieren. Es gibt nicht nur aktivierende Signale, sondern auch solche, die die T-Zelle inhibieren können, so wie CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4). Die verschiedenen Mechanismen der T-Zell-Regulation werden in der folgenden Abbildung 1 dargestellt.

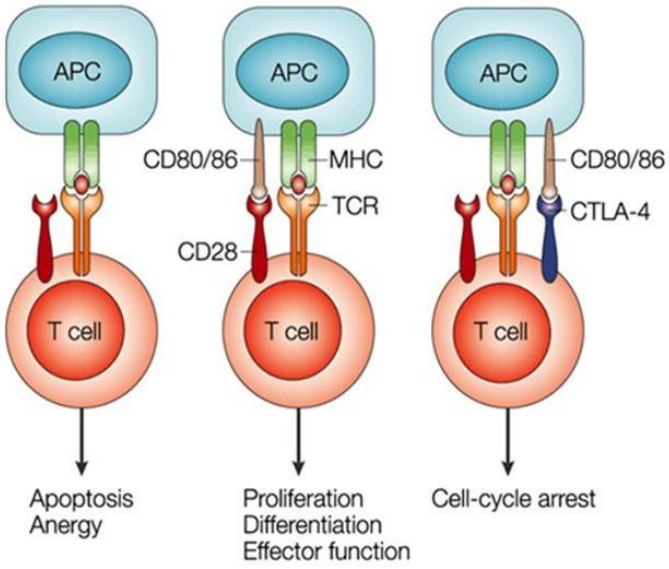


Abb.1: T-Zell-Regulation durch verschiedene Mechanismen der TCR-Bindung. APC: Antigen-präsentierende Zelle; MHC: Major histocompatibility complex; CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; CD80/86: Cluster of differentation 80/86; CD28:Cluster of differentation 28 (Abbildung aus Alegre et al. 2001).

Gleichzeitiges Erkennen des Peptidkomplex, der über MHC an die APC gebunden ist, durch den TCR und des costimulatorischen Moleküls CD80 oder CD86 auf der APC durch das costimulatorische Molekül CD28 auf der T-Zelle bewirkt T-Zell-Prolieferation, T-Zell-Differenzierung und Zytokinproduktion durch die T-Zelle (Alegre et al. 2001). Fehlt die gleichzeitige Bindung über CD28, so wird die T-Zelle apoptotisch oder anergisch (Alegre

et al. 2001). Ist das costimulatorische Molekül nicht aktivierend, sondern inhibierend wie CTLA-4, so geht die T-Zelle in den Zellzyklusarrest über (Alegre et al. 2001).

1.6 Zentrale und periphere Toleranz

Toleranz in der Immunologie bezeichnet das Phänomen des Immunsystems, körpereigene Substanzen als körpereigen zu erkennen und gegen diese keine Immunantwort einzuleiten. Man unterscheidet in der T-Zell-Entwicklung zwischen der zentralen und peripheren Toleranz. Der Erwerb der zentralen Toleranz der T-Zellen findet in ihrem primär lymphatischen Organ, dem Thymus, statt und beinhaltet drei Arten: Positive Selektion, negative Selektion und Neglect (Palmer 2003). Bei der positiven Selektion erkennt der T-Lymphozyt mit seinem T-Zell-Rezeptor MHC-Moleküle. Ist die Bindung zu stark, wird die Zelle apoptotisch. Dies bezeichnet man als negative Selektion. Neglect ist eine passive Art des Zelltodes. Die T-Zellen werden aufgrund eines fehlerhaften T-Zell-Rezeptors nicht positiv selektioniert und werden apoptotisch, da sie kein Überlebenssignal erhalten.
Somit überleben nur Zellen, die in ausreichendem Maße und nicht überschießend an MHC-Moleküle binden. Dieser Mechanismus soll helfen, die Entstehung autorekativer T-Zellen zu vermeiden und stellt so einen Schutz vor Autoimmunerkrankungen dar.

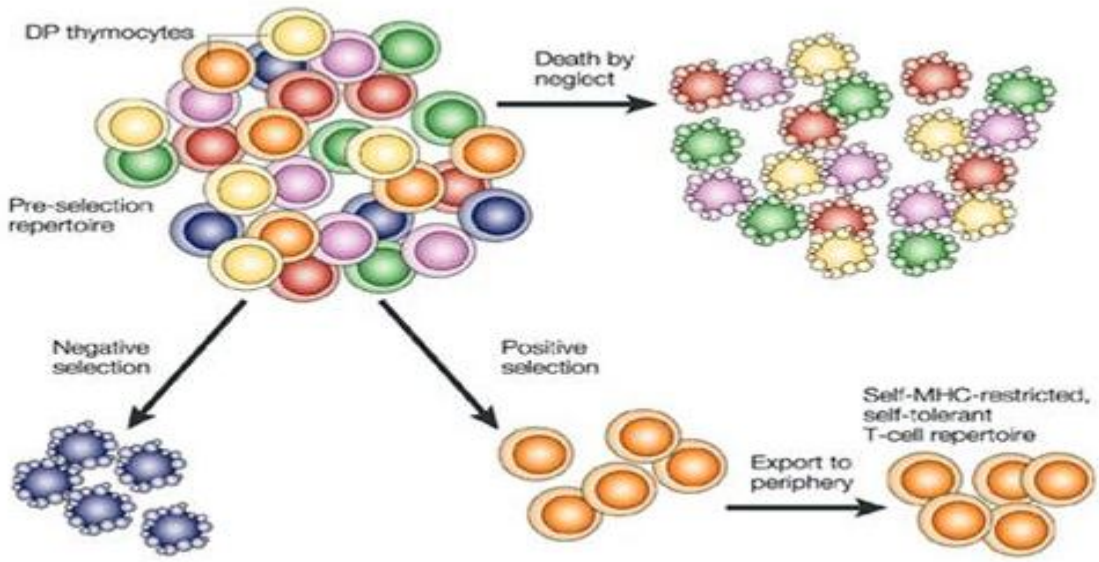


Abb. 2: T-Zell-Selektion. DP: double positive (Abbildung aus Palmer 2003).

Entkommen autoreaktive T-Zellen der zentralen Toleranz werden sie durch Mechanismen der peripheren Toleranz kontrolliert oder auch eliminiert (Shevach 2002). Einer der Kontrollmechanismen ist die Anergie. Anergisch wird eine T-Zelle, wenn ihr ein Antigen z.B. ohne Co-Stimulation präsentiert wird. Sie wird nicht apoptotisch, kann aber auch nicht wieder aktiviert werden. Des Weiteren gibt es den Mechanismus der Deletion. T-Zellen werden durch Fas-induzierte Apoptose deletiert, wenn ihnen ein Antigen kontinuierlich in hoher Konzentration präsentiert wird. Schließlich gibt es den bis jetzt am wenigsten verstandenen Mechanismus der T-Zellsuppression durch regulatorische T-Zellen, die u.a. durch Ausschüttung von TGF-β und Interleukin-10 andere Zellen hemmen können.

1.7 Antikörper

Antikörper sind ein zentraler Bestandteil der humoralen Immunantwort. Sie werden von B-Zellen gebildet und sind Teil des adaptiven Immunsystems. Antikörper besitzen Antigenbindungsstellen, die sogenannten Fab (fragment antigen binding)-Fragmente und Fc-(fragment crystallizable)-Fragmente. Während die Fab-Fragmente für die Spezifität der Antigenbindung verantwortlich sind, wird die Effektorfunktion des Antikörpers durch das Fc-Fragment bestimmt. An der schweren Kette des Fc-Fragments hängt ein Glykan, das seinerseits an verschiedene Zuckerreste gebunden sein kann. Man geht davon aus, dass durch das Glykan die offene Konformation des Antikörpers aufrecht erhalten wird, die für die Interaktion mit Fc-γ-Rezeptoren wichtig ist. Die Art des Zuckerrests kann dabei darüber entscheiden, ob eine proinflammatorische oder eine antiinflammatorische Immunantwort ausgelöst wird (Anthony et Ravetch 2010). Das Epitop eines Antikörpers, das sich am Fab-Fragment befindet, kann sich komplementär an das Epitop des passenden Antigens anlagern. Das Signal wird über den Fc-Teil weitergeleitet, so dass das Antigen unschädlich gemacht wird. Dieses Prinzip des Immunsystems macht man sich heutzutage in der Therapie vieler Erkrankungen zu nutze, beispielsweise in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis mit Biologicals. Hierbei handelt es sich um Antikörper, die sich spezifisch an Komponenten des Immunsystems anlagern können und somit die Immunantwort unterdrücken bzw. vermindern können. Gleichzeitig besteht unter dieser Therapie immer ein erhöhtes Infektionsrisiko, welches bei der Wahl des Therapeutikums unbedingt berücksichtigt werden sollte (Keyser 2011).

1.8 Sialinsäure

Wie in Abschnitt 1.7 bereits dargelegt, ist die Art des Zuckerrests am Glykan des Fc-Fragments eines Antikörpers von großer Bedeutung für dessen Effektorfunktionen. Wichtiger Bestandteil dieses Zuckerrests kann Sialinsäure sein. Die Menge an Sialinsäure kann die Affinität des Antikörpers zum Rezeptor beeinflussen. Diese Theorie basiert auf den Ergebnissen mehrerer Forschungsgruppen, die bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis ein verändertes Muster an Glycosilierung und Sialisierung im Vergleich zu Gesunden entdeckten (Parekh et al. 1985; Matsumoto et al. 1994). In einer Forschungsarbeit konnte nachgewiesen werden, dass mit Sialinsäure versehende Fc-Fragmente eine antiinflammatorische Reaktion bewirken können (Anthony et Ravetch 2010). Diese Fragmente veranlassten Makrophagen zur vermehrten Expression von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren und somit zu einer antiinflammatorischen Immunantwort. Eine andere Studie zeigte, dass IVIG (intravenöse Immunglobuline), deren Zuckerrest und somit die Sialinsäure entfernt wurde, nicht in der Lage waren eine antiinflammatorische Reaktionen auszulösen (Kaneko et al 2006).

1.9 Tiermodelle bei Diabetes mellitus

Um die Pathophysiologie des DMT1 besser zu erforschen, wurden verschiedene Tiermodelle als präklinische Modelle der Erkrankung entwickelt. Als Versuchstiere eignen sich Mäuse, da Entwicklung und Verlauf des DMT1 sich bei Maus und Mensch ähnlich sind. Außerdem werden Antikörper zur Behandlung vieler Krankheiten mit murinen (mausartigen) Anteilen versehen. Beispielsweise wird durch einen Anti-CD3-Antikörper (Muronomab) oder den Calcineurininhibitor Cyclosporin die T-Zell-Aktivierung inhibiert und so der Verlauf des DMT1 verlangsamt. Durch externe Insulinzufuhr können Betazellen in einen Ruhezustand überführt werden, so dass sie durch Inaktivität weniger anfällig für Zerstörung sind (Buschard 2011).
In unseren Untersuchungen verwendeten wir das EAD-Modell. Durch Immunisierung mit spezifischen Insulinantigenen (DNA- Impfung) erfolgte bei den Versuchstieren eine $CD8^+$-T-Zell-vermittelte Induktion eines experimentellen Autoimmundiabetes (EAD). Für die Versuchsreihe wurden RIP-B7.1 (CD80) transgene Mäuse verwendet. B7.1 entspricht dem Oberflächenmarker CD80, der sich auf B-Zellen, Monozyten und Antigen-Präsentierenden Zellen (APC) befindet und verantwortlich für die costimulatorische Aktivierung von T-

Zellen ist. Es bindet an den Oberflächenmarker CD28 der T-Zelle und bewirkt eine Zytokinausschüttung und T-Zellproliferation. Im RIP-B7.1 Mausmodell bewirkt der RIP-Promotor die transgene, selektive Expression von B7.1 auf den Betazellen, die somit ein costimulatorisches Signal für die T-Zellen ausbilden können. Durch zusätzliche Co-Stimulation durch B7.1 auf den Betazellen können autoreaktive $CD8^+$-T-Zellen mit dem Zielgewebe interagieren und die Insulin exprimierenden Zellen spezifisch zerstören. Daher können, durch Insulinimpfung ausgelöst, aktivierte T-Zellen in das Pankreas einwandern und eine Betazellzerstörung einleiten. Dies führt letztlich zum Ausbruch von DMT1 (Karges et al. 2002). Im EAD-Mausmodell manifestiert sich die Erkrankung ca. drei Wochen nach der Impfung (Karges et al. 2007).

1.10 Hypothese und Ziele

Es ist bekannt, dass Insulin ein wichtiges Autoantigen bei der Entstehung des DMT1 darstellt. In Forschungsarbeiten über Sialinsäure wurde herausgefunden, dass durch Anhängen von Sialinsäure an Fc-Fragmente eine antiinflammatorische Immunantwort bewirkt werden kann (Anthony et Ravetch 2010). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Hypothese, dass die Modifikation eines Insulinantikörpers mit Sialinsäure am Fc-Fragment zu einer Verminderung der Immunantwort führt und die Entwicklung eines DMT1 mindestens verzögert werden kann.

In einem Tiermodell des DMT1 sollten daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

A) Können Antikörper, die spezifisch an Insulin binden, den Krankheitsverlauf eines experimentellen Autoimmundiabetes beeinflussen oder sogar verhindern?

B) Hat eine biochemische Modifikation der Insulin-Antikörper mit einem unterschiedlichen Anteil an Sialinsäure einen Effekt auf die Diabetesentwicklung?

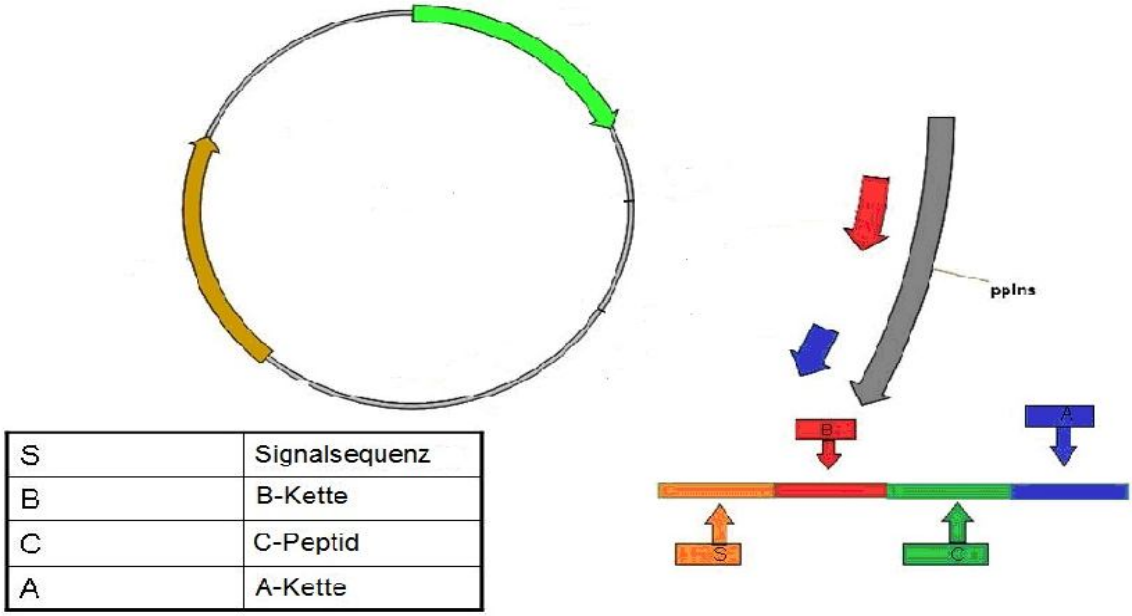
2. Materialien und Methodik

2.1 Tierexperimentelle Studien

Für die Versuchsreihe wurden RIP-B7.1 (CD80) transgene Mäuse (siehe Abschnitt 1.9) mit C57BL/6(H-2^b)-Hintergrund (zurückgekreuzt über fünfzehn Generationen) verwendet. C57BL/6(H-2^b) ist ein Mausinzuchtstamm, der aufgrund seines guten Fortpflanzungsverhaltens verwendet wird. Die Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen (Spezial pathogen frei) gezüchtet und gehalten. Die Studie wurde nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Es wurden männliche und weibliche Versuchstiere verwendet, da im Gegensatz zum NOD-Mausmodell die Diabetesentwicklung im EAD-Modell geschlechtsunspezifisch erfolgt. Durch DNA-Immunisierung mit einem Insulin- kodierenden Plasmidvektor erfolgte bei den Tieren eine $CD8^+$-T-Zell-vermittelte Induktion eines experimentellen Autoimmundiabetes (EAD). Die Blutzuckerspiegel der Mäuse wurden ab der dritten Woche nach DNA-Immunisierung einmal pro Woche kontrolliert. Lag der Blutzuckerspiegel nach zweimalig aufeinanderfolgenden Messungen über einem Wert von 250mg/dl, galten die Tiere definitionsgemäß als zuckerkrank (Rajasalu et al. 2004).

2.2 DNA-Impfung

EAD lässt sich durch DNA-Impfung über einen Plasmidvektor (pCI) (Promega, Mannheim, Deutschland), der die cDNA des gewünschten Antigens enthält, induzieren (Abbildung 3). In dieser Studie erfolgte die intramuskuläre Impfung mit dem Vektorsystem ppInsIIΔA12-21. Dies bedeutet, dass mit PräproinsulinII ohne den letzten Decamer der A-Kette geimpft wurde. Dieses Antigen induziert K^b/B22-29-spezifische $CD8^+$-T-Zellen und konsekutiv EAD in RIP-B7.1 Mäusen. K^b/B22-29 bedeutet, dass das Epitop an Position 22 der B-Kette des Insulin beginnt. Das Epitop ist ein Oktamer. Murines PräproinsulinII (Genbank Xo4727) besteht aus 110 Aminosäuren und wurde zwischen der ecoRI/xba-Lokation in einen pCI-Vektor kloniert. Große Mengen des Plasmidvektors wurden für die Immunisierung von der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die Tiere erhielten 100 µg Plasmid- DNA aufgelöst in 100ml PBS. Die Injektion erfolgte in den Musculus tibialis anterior.



S	Signalsequenz
B	B-Kette
C	C-Peptid
A	A-Kette

Abb. 3: Struktur des murinen Präproinsulin-2-Gens, bestehend aus Signalsequenz, B-Kette, C-Peptid, A-Kette; Klonierung des Gens in pCI-Vektor und Verwendung für DNA-Immunisierung. ppIns: präproInsulin.

Nicht geimpfte Mäuse entwickeln auch nach länger Beobachtungszeit (ca. ein Jahr) keinen Diabetes und dienen als Kontrolltiere.

2.3 B22 und B22-Mimo

Diabetische und immunologische Veränderungen bei DMT1 sind am besten im Inselzellapparat der Bauchspeicheldrüse und in der Milz als wichtigstes sekundär lymphatisches Organ zu erkennen und zu beurteilen. Den Mäusen wurden Milz und Pankreas entnommen, die T-Zellen isoliert und spezifisch einer Peptidstimulation mit B22 und B22-Mimo unterzogen. Das Epitop B22 ist ein Oktamer und befindet sich an Position 22 der B-Kette des Insulin. MHC-I-Epitope enden oft mit einer nicht-polare Aminosäure, wie auch in diesem Fall. B22 hat die Sequenz RGFFYTPM. Methionin an der letzten Position trägt ein Schwefelatom in der Thioethergruppe der Seitenkette, welches Bindungen durch Ausbildung von Disulfidbrücken erschweren kann. Im Gegensatz dazu hat B22-Mimo die Sequenz RGFFYTPL, d.h. die letzte Aminosäure Methionin wurde gegen Leucin ausgetauscht. Leucin ist ebenfalls eine nicht-polare Aminosäure, enthält aber kein Schwefelatom. Da Leucin daher nicht in der Lage ist, Disulfidbrückenbindungen auszubilden, sollte das Bindungsverhalten bei B22-Mimo stärker sein.

2.4 Experimentverlauf

Die Studie wurde als einfach verblindete Studie durchgeführt, d.h. die genauen Eigenschaften der Antikörper waren vor und während der Versuche nicht bekannt. Es gab zwei verschiedene Insulinantikörperspezies mit unterschiedlichem strukturellem Aufbau, die im Folgenden mit Antikörper 0 und Antikörper 1 bezeichnet werden. AK 1 ist zu 50% mit Sialinsäure am Fc-Fragment versehen worden, während AK0 keine Sialinsäure am Fc-Fragment trägt. In Experiment 1 wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von fünf Wochen einmal pro Woche mit einer hohen Dosis des Antikörpers (300 µg) pro Tier behandelt. In Experiment 2 wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von acht Wochen einmal pro Woche mit einer geringeren Konzentration des Antikörpers (100 µg) pro Tier behandelt. Es gab jeweils eine Kontrollgruppe, die mit PBS (phosphate-buffered saline) in jeweils gleicher Menge und gleicher Häufigkeit wie die Verumgruppe behandelt wurde. Die Injektionen der Antikörper/PBS erfolgten intraperitoneal. Die erste Gabe der beiden AK-Spezies fand vor der Immunisierung statt, um zu prüfen, ob diese präventive Gabe einen größeren Benefit erzeugt. Abbildung Nummer 4 und 5 zeigen eine schematische Darstellung des Experimentverlaufs.

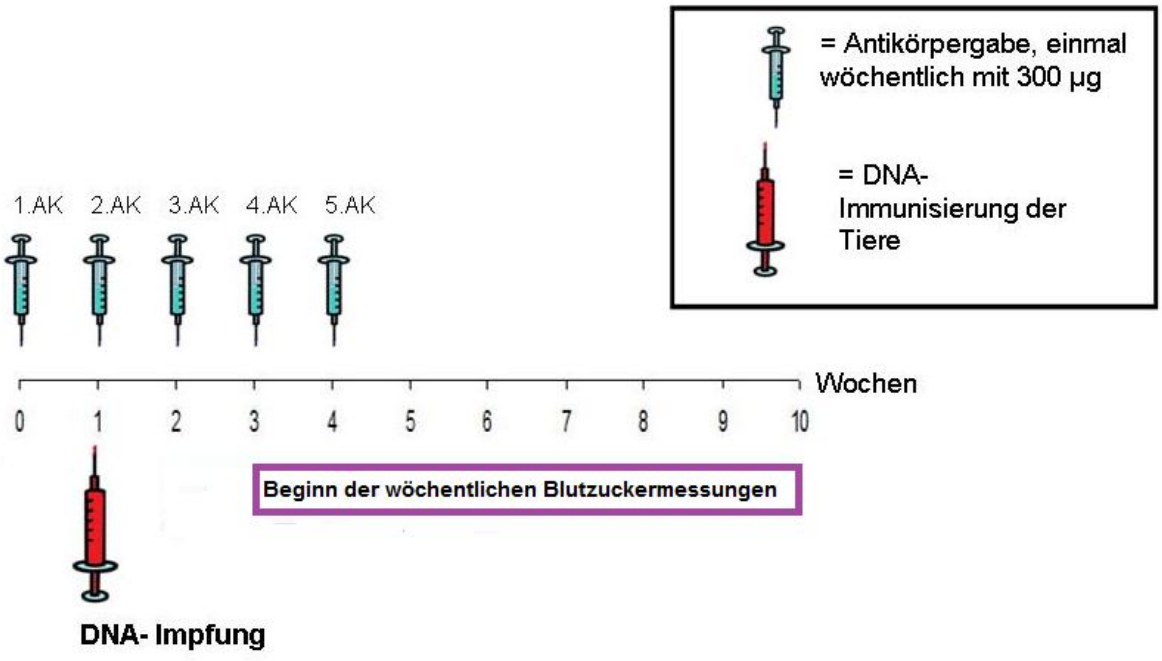


Abb. 4: Graphische Darstellung des Verlaufs von Experiment 1, bei dem die Versuchstiere über 5 Wochen einmal pro Woche mit 300 µg der Antikörper pro Tier behandelt wurde, die Zeitleiste ist in Wochen aufgeteilt. Totale Dosis an Antikörper:1500µg. AK: Antikörper.

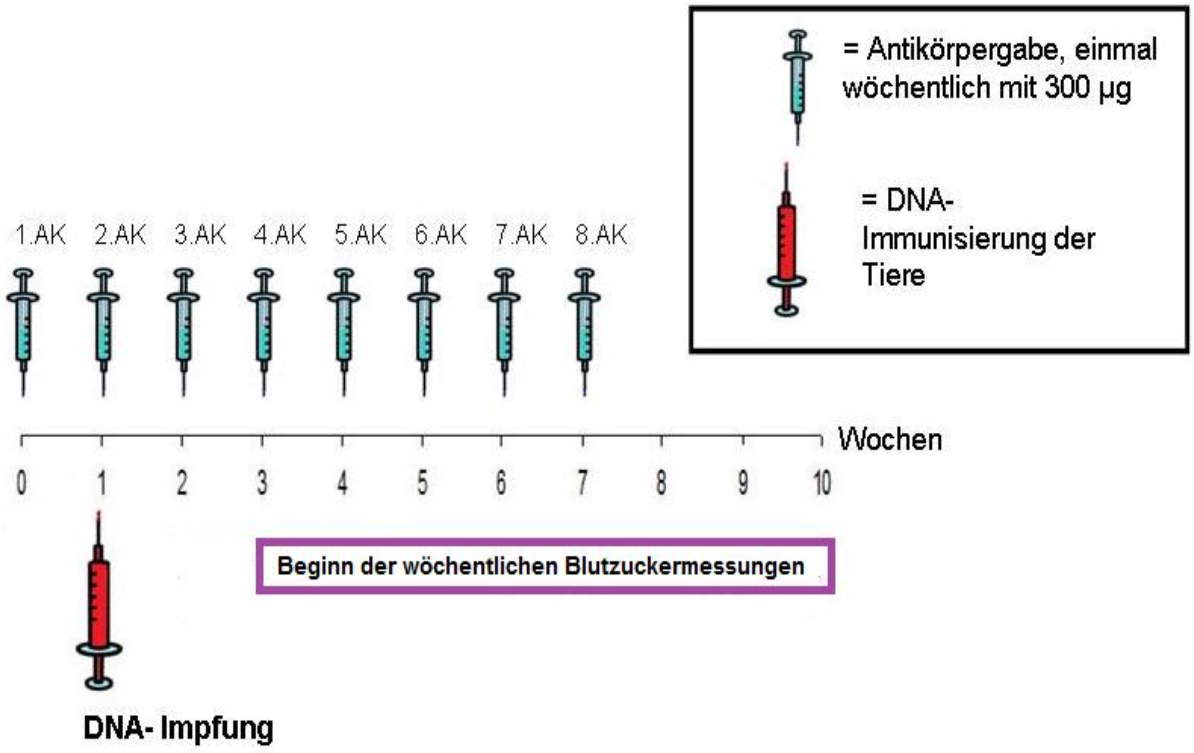


Abb. 5: Graphische Darstellung des Verlaufs von Experiment 2,bei dem die Versuchstiere über 8 Wochen einmal pro Woche mit 100 µg der Antikörper pro Tier behandelt wurde, die Zeitleiste ist in Wochen aufgeteilt. Totale Dosis an Antikörper: 800 µg. AK: Antikörper

2.5 Peptidstimulation der T-Zellen in der Milz

Die Peptidstimulation wurde durchgeführt, um die Interferon-γ-Ausschüttung der T-Zellen, die spezifisch auf die verwendeten Peptide reagieren, zu messen. Nach Entnahme wurde die Milz durch ein Sieb mit RMPI-Medium (Hydrogencarbonat-Puffersystem zur Zellkultur) gefiltert. Das RMPI-Medium wurde mit 10% FCS (foetal calf serum), Glutamax (L-alanyl L-glutamine) und 1% Penicilin/Streptomycin (Gibco BRL, Deutschland) ergänzt. Danach wurden die Erythrozyten mit Hilfe von Lysepuffer (42,8 g NH_4Cl und 10,3 g Tris, aufgelöst in 5 Liter deionisiertes Wasser mit PH-Wert 7,2) lysiert, die Zellen zweimal mit RMPI-Medium gewaschen und anschließend in der Neubauer-Kammer gezählt. Die Milzzellen wurden resuspendiert und auf eine 96-Rundbodenloch-Platte mit 1,5 x 10^6 Zellen/Loch aufgebracht. Anschließend wurden 15 µg/ml Peptid in dreifacher Ausführung und Brefeldin A Inhibitor (Lacton-Antibiotikum zur Hemmung der Zellsekretion, von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) hinzugefügt. Als Peptide wurden OVA-Peptid als falsches Peptid, B22 als Testpeptid und B22-Mimo als Testpeptid (Thermo Fisher Scientific, Ulm, Deutschland) verwendet. Es sollte getestet werden, ob sich das Stimulationsverhalten durch die Abwandlung in der Aminosäurese-

quenz ändern würde. Zudem gab es eine Negativkontrolle, der kein Peptid hinzugefügt wurde. Die Platten kamen zur Inkubation für 20 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Peptide.

Peptid	**Sequenz**
OVA	SIINFEKL
B22	RGFFYTPM
B22Mimo	RGFFYTPL

Nach Stimulierung über Nacht wurden die Zellen zweimal mit Puffer A (PBS ohne Mg^{++}/Ca^{++}, 0,5 % w/v BSA, 0,1 % w/v Natriumacetat) gewaschen, geblockt mit FC-Block mAB 2.4G2 (BD Pharmigen, Substanz zur Blockade des FC- Rezeptors), FACS-A Ratio 1: 1 und danach mit CD3- sowie CD8-Antikörpern gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen mit PBS, das 2 % Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) beinhaltete, 15 Minuten lang fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit Puffer A gewaschen und mit Puffer B (PBS ohne Mg^{++}/Ca^{++}, 0,5 % w/v BSA, 0,05 % w/v Natriumacetat, 0,5% w/v Saponin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) permeabilisiert. Danach erfolgte eine Interferon-γ-Färbung und eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Nachdem die Inkubationszeit vergangen war, wurden die Proben zweimalig mit Puffer B gewaschen, in Puffer A resuspendiert und in FACS-Röhrchen für die FACS-Analyse überführt. Die Antikörper wurden von der Firma BD Pharmigen (Hamburg, Deutschland) bezogen und sind in Tabelle Nr. 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Fluorchrome zur Antikörperfärbung und ihre Spezifität.

Fluorchrom	**Spezifität**
PE	CD3ε
PerCP/Alexa700	CD8α
APC	IFN-γ

2.6 Peptidstimulation der T-Zellen im Pankreas

Nach Entnahme wurde das Pankreas in 15 ml Kollagenase-Medium (Kollagenase von Clostridium histiolyticum, Sigma, Hamburg) überführt, zerkleinert und 20 Minuten bei 37°C zum Verdau inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch ein Sieb mit RMPI-Medium gefiltert. Danach wurden die Erythrozyten mit Hilfe von Lysepuffer lysiert und

anschließend zweimal mit RMPI- Medium gewaschen. Um nur $CD8^+$-T-Zellen zu erhalten, wurde das „MACS-isolation-kit“ der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden mit einer Antikörperlösung versetzt, die eine Isolierung der $CD8^+$-T-Zellen bewirkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit $CD8^+$(Ly-2)-mirco-beads (polymere Partikel, an deren Oberfläche $CD8^+$-T-Zellen per Magnetismus hängen bleiben) bei 4°C für 15 Minuten. Nach Inkubation wurden die Zellen durch eine Säule mit einem magnetischen Feld gespült, in dem alle Zellen außer den $CD8^+$-T-Zellen reteniert wurden. Die Zellen wurden resuspendiert und auf eine 96-Rundbodenloch- Platte mit 1,5 x 10^6 Zellen/Loch aufgebracht. Anschließend wurden die Zellen stimuliert und gefärbt wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. Es wurden die gleichen Antikörper, die in Abschnitt 2.5 beschrieben wurden, verwendet.

2.7 Tetramerfärbung

Die Tetramerfärbung wurde durchgeführt, um die Anzahl der T-Zellen in der Milz und im Pankreas, die spezifisch auf das verwendete Epitop reagieren, zu detektieren. Im Grunde ist die Methode ähnlich zur Peptidstimulation, aber in dieser Färbung wird die T-Zellspezifität direkt getestet, im Falle der Peptidstimulation indirekt über die Menge an ausgeschüttetem Interferon-γ. Das Tetramer setzt sich aus 4 MHC-I-Molekülen, die mit Peptiden beladen und von einem Streptavidinkern zusammen gehalten werden, zusammen. Die Sequenz der Peptide ist die B22-Mimosequenz (RGFFYTPL). Die Tetramerfärbung von T-Zellen erfolgt bis zur Überführung in die 96-Rundbodenlochplatte wie die Peptidstimulation. Die Milz- und die Pankreaszellen wurden für 10 Minuten mit FC-Block mAB 2.4G2 (BD Pharmigen, Substanz zur Blockade des FC- Rezeptors) inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe des Tetramers und eine 30-minütige Inkubation bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen zweifach mit Puffer A gewaschen und mit den CD3- sowie CD8-Antikörper (Tabelle 4, Abschnitt 2.5) gefärbt Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen mit PBS, das 2 % Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) beinhaltete, 15 Minuten lang fixiert. Nach diesem Schritt wurden die Zellen zweifach mit Puffer B gewaschen, in Puffer A resuspendiert und im FACS-Röhrchen zur FACS-Analyse überführt.

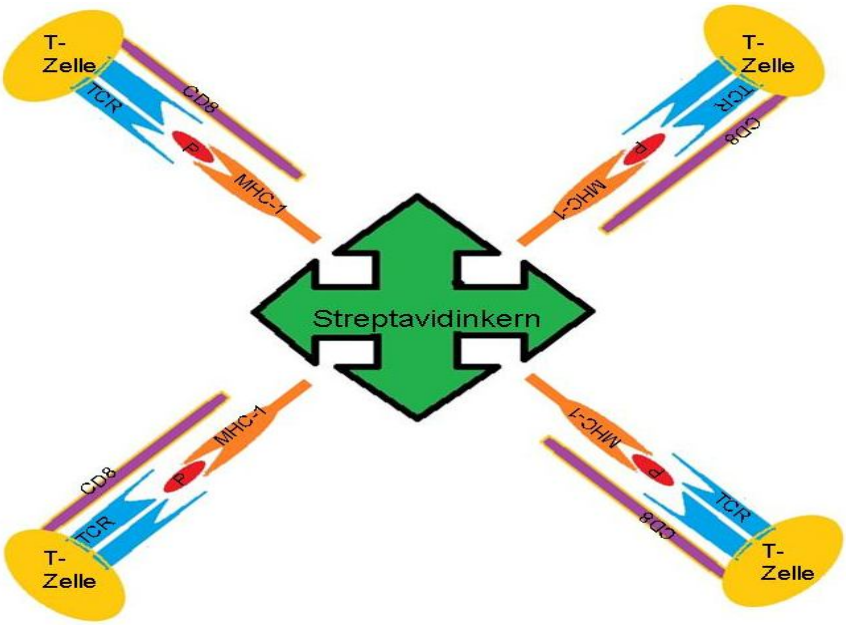


Abb. 6: Darstellung eines Tetramers, bestehend aus einem Streptavidinkern mit vier Bindungstellen. CD8: Cluster of differentation 8; MHC-1: Major histocompatibility complex-1; P: Peptid.

2.8 Durchflusszytometrieanalyse/FACS

Die Proben wurden im FACS-Calibur-Flusszytometer (Becton & Dickinson, Mountain View, CA) analysiert. Das in FSC/SSC unterteilte Streudiagramm wurde so angelegt, dass tote Zellen eliminiert wurden, um ausschließlich eine Analyse der aktivierten T-Zellen zu erhalten. Die Daten wurden mit Win MDI 2.9 von J. Trotter (Scripps Institute, La Jolla, California, USA) analysiert.

2.9 Hämatoxilin-Eosin-Färbung der Pankreaspräparate

Die HE-Färbung diente dazu, geeignete Langerhans-Inseln im Kryopräparat zu finden, um diese anschließend in einer Immunofluoreszenzfärbung weiter zu verwenden. Aus den in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Bauchspeicheldrüsen der Mäuse wurden im Kryotom Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt und anschließend auf einen Objektträger (15*15*5mm) aufgebracht. Dann erfolgte eine Fixierung der Präparate mit Aceton. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit Isopropanol in 100-, 90-, 80-,70-prozentiger Reihenfolge für jeweils zwei Minuten rehydriert. Anschließend wurden die Präparate mit destilliertem Wasser abgespült. Danach erfolgte eine fünfminütige Kernfärbung mit Hämatoxilin, das im Anschluss mit lauwarmem Leitungswasser abgewaschen wurde. Um eine Farbstabilisierung zu erzeugen, wurde das Präparat fünf Minuten an der Luft getrocknet.

Im Anschluss wurde es zur zytoplasmatischen Färbung 30 Sekunden in Eosinrot getaucht, danach wurde das Eosinrot mit Aqua dest abgespült. Dann wurden die Präparate zur Dehydrierung jeweils für einige Sekunden in Isopropanol in aufsteigender Prozentreihe von 70% bis 100% eingetaucht. Zum Abschluss erfolgte zur vollständigen Entwässerung und Aufhellung der Präparate ein jeweilig fünfminütiges Einwirken in Xylol 1- und Xylol-2-Lösung.

2.10 Immunfluoreszensfärbung des Pankreasgewebes

Die angefertigten Kryopräparate wurden nach der Fixierung in Aceton mit 2 % BSA mit PBS + 0,1 % NaN_3 + Fc-Block (1:1) für 10 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifisches Bindungsverhalten der Antikörper zu vermeiden. Die Zellen wurden danach gewaschen und mit Primärantikörpern, die in PBS mit 2 % BSA gelöst wurden, gefärbt und über 1,5 Stunden inkubiert. Es wurde mit CD8 Alexa Fluor 647 (BD Pharmigen) 1:25, guinea-pig-anti-insulin (DAKO) 1:25, CD4 FITC (BD Pharmigen) 1:15 und Dapi (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. Dapi ist ein Farbstoff, der zur Färbung von Zellkernen verwendet wird und in diesem Protokoll direkt in der Fluoromountfixierlösung enthalten ist. Anschließend wurden die Präparate mit PBS gewaschen und es erfolgte die Zugabe eines Sekundärantikörpers für Insulin mit erneuter 1,5 stündiger Inkubation. Der Sekundärantikörper war anti-guinea-pig TRITC (Sigma) 1:25 für Insulin. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde erneut mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit PBS inkubiert. Um die Färbungen haltbar zu machen, wurden sie mit Fixierungskleber, der zusätzlich die Dapilösung enthält, bedeckt (proLong Gold antifade reagent with dapi *P 36931, Invitrogen, Darmstadt) und anschließend wurden die Objektträger mit einem Deckplättchen bedeckt und es erfolgte die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Göttingen).

2.11 Datenanalyse

Die statistische Auswertung wurde eigenständig durchgeführt. Aus den ab Woche drei einmal wöchentlich gemessenen Blutzuckerwerten wurden Schaubilder erstellt. Die gemessenen Werte wurden vor Erstellung der Graphen logarithmiert, um nicht normalverteilte Werte besser darstellen zu können. Außerdem wurden eine Mittelwertsberechnung sowie eine Berechnung der Standardabweichung der FACS-Daten, die bei der Pep-

tidstimulation gewonnen wurden, durchgeführt. Die Anzahl der gemessenen „Events“ wurde bei geringerer Zellzahl extrapoliert, um vergleichbare Werte zu erhalten. Auf Basis dieser Werte erfolgte die Mittelwertsberechung. Um die Signifikanz der Intervention zu testen, wurde der X^2-Test durchgeführt. In dieser Studie sollte getestet werden, ob die Diabetesentwicklung abhängig von der Antikörperbehandlung ist oder nicht. Da es zwei unterschiedliche Experimentabläufe gab, wurde der Test für jeden Ablauf berechnet. Das zu testende Merkmal ist, ob die Tiere bereits an Diabetes mellitus erkrankt waren oder nicht. Die H0-Hypothese besagt, dass das Überleben der Tiere unabhängig von der Antikörperbehandlung ist, während die H1-Hypothese gegenteilige klinische Ergebnisse annimmt. Die Hypothesen werden wie folgt formuliert:

H0: Überleben ist unabhängig von AK-Behandlung, H1: Überleben ist abhängig von AK-Behandlung. Die Anzahl der Tiere, die an Diabetes mellitus erkrankten, wurde im Verhältnis zu den gesunden Tieren in einer Vierfeldertafel aufgelistet.

Tabelle 4: Vierfeldertafel zur Berechnung des Chi-Quadrat-Tests

	Daten 1	Daten 2	Summe
Kategorie 1	Krank = a	Krank = b	a+b
Kategorie 2	Gesund = c	Gesund = d	c+d
Summe	a +c	b+d	a+b+d+c

Der Freiheitsgrad bei der Berechnung eines X^2-Tests errechnet sich anhand der Formel (2-1)*(2-1)= 1, somit gewählter Freiheitsgrad 1, daraus resultierendes Signifikanzniveau: 0,05.

Der X^2-Test mit der Formel für eine 2*2-Vierfeldertafel durchgeführt:

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2(a+b+d+d)}{(a+b)(c+d)(b+d)(a+c)}$$

Die errechneten Werte wurden mit einer Tabelle zur Interpretation des X^2-Werts in Abhängigkeit von Freiheitsgrad und Signifikanzniveau verglichen. Ein Wert unter 3,841 bedeutet, dass das berechnete Ergebnis nicht signifikant ausgefallen ist.

Tabelle 5: Chi-Quadratwerte in Abhängigkeit von Freiheitsgrad und Signifikanzniveau.

FG	0.5	0.10	**0.05**	0.02	0.01	0.001
1	0.455	2.706	**3.841**	5.412	6.635	10.827
2	1.386	4.605	5.991	7.824	9.210	13.815
3	2.366	6.251	7.815	9.837	11.345	16.268
4	3.357	7.779	9.488	11.668	13.277	18.465
5	4.351	9.236	11.070	13.388	15.086	20.517

3. Ergebnisse

3.1 Inzidenzkurven

Ein Schwerpunkt dieser Studie ist es, den Krankheitsverlauf des experimentellen DMT1 bei den verschiedenen Versuchstieren von Experiment 1 und 2 zu beobachten und eventuelle Unterschiede festzustellen und weiter zu analysieren.

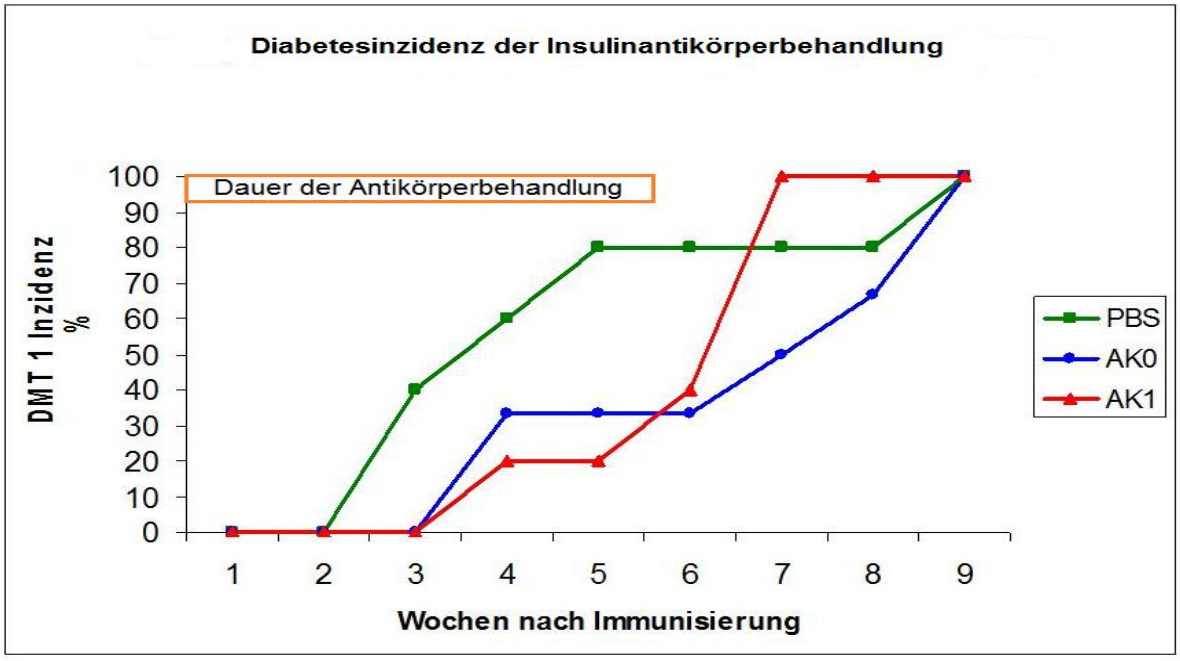


Abb. 7: Diabetesinzidenz der mit 300 µg Antikörper i.p./pro Tier/pro Woche für 5 Wochen behandelten Tiere (Experiment 1), PBS(Kontrollegruppe): Anzahl der Tiere= 5, AK 0: Anzahl der Tiere = 6, Ak1; Anzahl der Tiere = 5; AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Abbildung 7 stellt die Inzidenzkurven für DMT1 der Antikörperbehandlung dar. Dieses Diagramm drückt aus, wie viele Wochen nach der DNA-Impfung und Behandlung mit den Antikörpern/PBS die B7.1-Versuchstiere diabetisch wurden. Die Tiere wurden fünf Wochen lang einmal pro Woche mit einer Antikörperkonzentration (intraperitoneale Injektion) von 300 µg pro Tier behandelt. Somit wurden sie über einen kürzeren Zeitraum im Vergleich zu Experiment 2, jedoch mit einer höheren Antikörperkonzentration behandelt. Die erste Gabe erfolgte eine Woche vor der DNA-Impfung. Man erkennt, dass in der mit PBS behandelten Mausgruppe die Krankheit im Vergleich zu den mit Antikörpern behandelten Versuchstieren früher ausbricht. Die Verlaufskurve der mit AK1 behandelten Tiere zeigt einen trägeren Anstieg der Inzidenz als die Kurven der PBS- und AK0- Gruppe. Zwischen Woche vier und Woche fünf lässt sich eine Plateauphase aus der Abbildung ablesen. In der Gruppe AK0 zeigt sich ebenfalls eine Plateauphase, welche in Woche 4 beginnt. Der graphische Verlauf der verschiedenen Inzidenzkurven könnte als Unterschied zwischen der Antikörperbehandlung und der Scheinbehandlung mit PBS interpretiert werden. Die PBS-Tiere werden früher diabetisch und die Krankheitsinzidenz steigt schneller an. Nach 4 Wo-

chen sind 60% der Tiere der Kontrollgruppe diabetisch. Nach fünf Wochen sind in der PBS-Gruppe bereits 80% der Tiere diabetisch, hingegen in der AK1-Gruppe 20%.

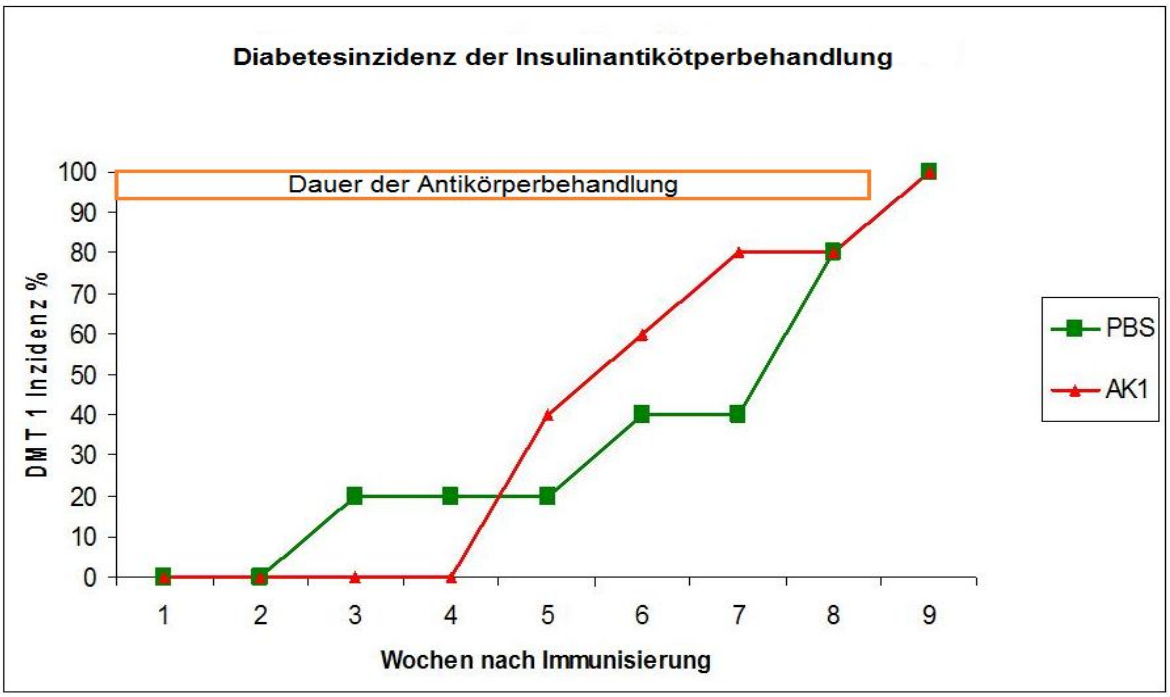


Abb. 8: Diabetesinzidenz der mit 100 µg Antikörper i.p./pro Tier/pro Woche für 8 Wochen behandelten Tiere (Experiment 2), PBS: Anzahl der Tiere = 5, AK 1: Anzahl der Tiere = 5; AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Abbildung 8 stellt die Inzidenz des DMT1 von Experiment 2 dar. Die Versuchstiere wurden über 8 Wochen einmal pro Woche mit einer Antikörperkonzentration von 100 µg pro Tier behandelt. Somit wurden die Tiere über einen längeren Zeitraum mit einer geringeren Antikörperkonzentration behandelt als im vorherigen Versuch. Anhand des Kurvenverlaufs ist ersichtlich, dass in der PBS-Gruppe die ersten Tiere bereits in Woche drei diabetisch wurden, während der Verlauf der Kurve bei der Gruppe AK 1 erst in Woche 5 einen Inzidenzanstieg aufweist. Vergleicht man Abbildung 7 mit Abbildung 8, so waren bei Experiment 1 nach Beendigung der Antikörpergabe in der AK1-Gruppe 20 % der Tiere diabetisch (Abbildung 7), während bei Experiment 2 nach Beendigung der Antikörpertherapie 80 % der Tiere diabetisch waren (Abbildung 8). Nachdem die Ergebnisse bei der AK1-Gruppe in Experiment 1 zufriedenstellend waren, wurde entschieden, Experiment 2 nur mit AK1 fortzuführen. Zusammenfassend konnte in beiden Experimenten eine präventive Immunmodulation durch die Antikörperbehandlung gezeigt werden, allerdings war diese nur gering ausgeprägt. Wie erwartet entwickelten die PBS-Versuchstiere früher DMT1, während die Entwicklung der Krankheit bei den mit Antikörper behandelten Tieren leicht verzögert war. Dieser Verlauf der Diabetesentwicklung setzte sich in Experiment 2 nach der fünften Woche genau gegensätzlich fort, d.h. bei diesem Experiment brach DMT1 bei den

Tieren, die mit Antikörper 1 behandelt worden waren, früher aus. Dies lag vielleicht an der geringeren Antikörperkonzentration (100 µg anstatt 300 µg).

3.2 Graphische Darstellung der gemessenen Blutzuckerwerte

Ab der dritten Woche nach der ersten Antikörpergabe wurde einmal pro Woche der Blutzuckerwert aller Versuchstiere bestimmt um zu kontrollieren, wann es zum Ausbruch des DMT1 gekommen war und um die einzelnen Blutzuckerwerte miteinander zu vergleichen.

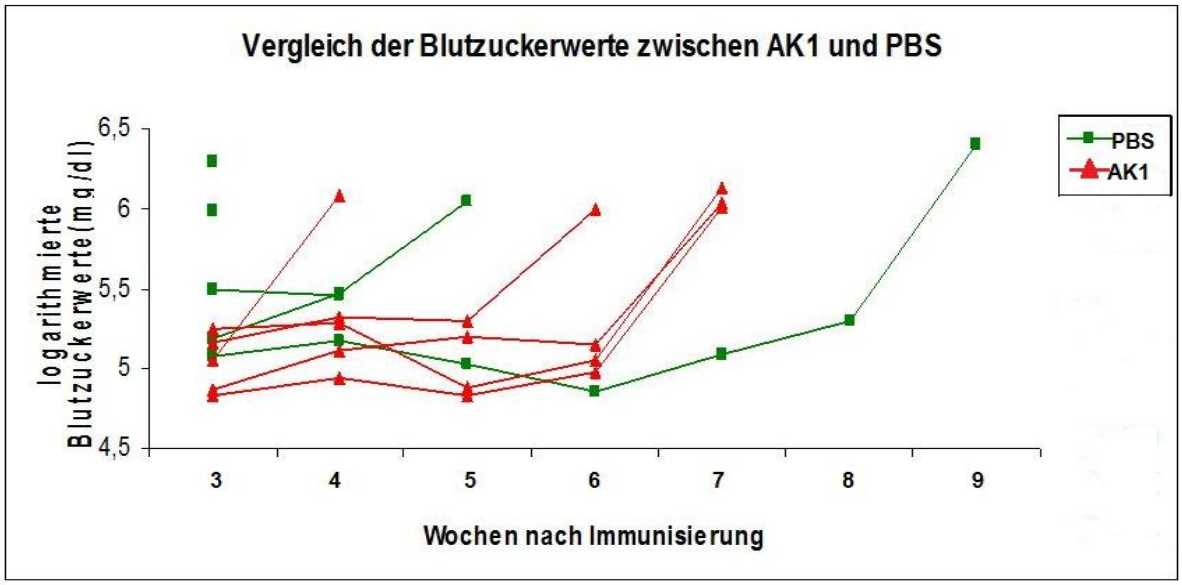


Abb. 9a: Vergleich der Blutzuckerwerte zwischen AK1 und PBS, AK1: n = 5, PBS: n = 5, die Versuchstiere wurden mit 300 µg Antikörper i.p./pro Tier/pro Woche für 5 Wochen behandelt. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline. Es wurde mit ln(x) gerechnet.

In Abbildung 9a sind die gemessenen Blutzuckerwerte der AK1-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe von Experiment 1 graphisch dargestellt. Aus der Graphik lässt sich ablesen, dass in der Gesamtheit die Blutzuckerwerte in der AK1-Gruppe niedriger sind als in der PBS-Gruppe.

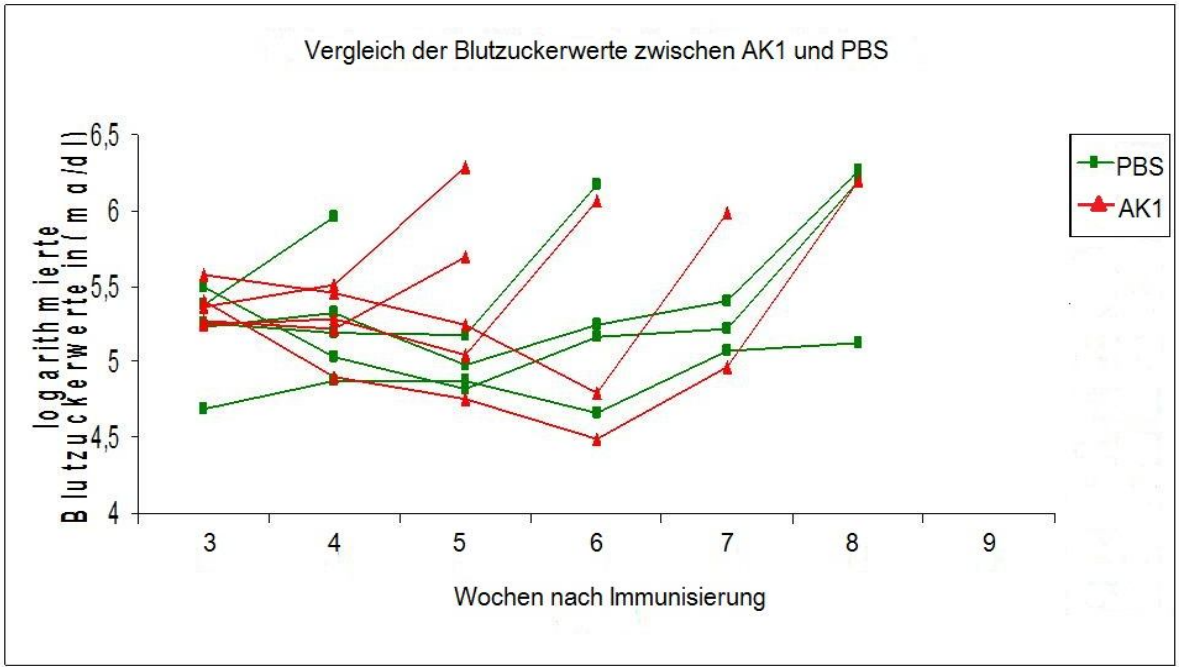


Abb. 9b: Vergleich der Blutzuckerwerte zwischen AK1 und PBS, AK1: n = 5, PBS: n = 5, die Versuchstiere wurden mit 100 µg Antikörper i.p. /pro Tier/pro Woche für 8 Wochen behandelt. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline. Es wurde mit ln(x) gerechnet.

In Abbildung 9b sind die gemessenen Blutzuckerwerte der AK1-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe von Experiment 2 graphisch dargestellt. Die Reduktion der Konzentration des Antikörpers von 300 µg auf 100 µg hatte eine signifikante Auswirkung auf die Diabetes-entwicklung. Die Werte zeigen keine große Variation zwischen den beiden Gruppen.

3.3 Ergebnisse des X^2-Test

Im X^2-Wert wurde verglichen, ob die Diabetesinzidenz durch die Antiköperbehandlung verändert wird oder nicht.

Tabelle 6: Berechnete X^2- Werte für alle Zeitpunkte ab Woche 3 bis Woche 8, Vergleich PBS-Gruppe mit AK1von Experiment 1. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Woche	PBS	AK1	X^2-Wert
1	0/5	0/5	-
2	0/5	0/5	-
3	2/5	0/5	2,5
4	3/5	1/5	1,66666667
5	4/5	1/5	3,6
6	4/5	2/5	1,66666667
7	4/5	5/5	1,11111111
8	4/5	5/5	1,11111111
9	5/5	5/5	-

Die errechnete Wahrscheinlichkeit liegt zu jedem berechneten Zeitpunkt unter dem Signifikanzniveau von 5%, so dass die Nullhypothese, die keinen Unterschied vermutet hatte, bestätigt ist. Interpretiert wurden die Werte anhand Tabelle 4 im Abschnitt 2.11 des Material- und Methodenteils dieser Arbeit. Somit ist laut Test die Diabetesentwicklung unabhängig von der Antikörperbehandlung Ak1. Berechnet wurden die X^2-Werte ab Woche 3, da in Woche 1 und 2 noch keine Tiere erkrankt waren und somit kein Unterschied vorhanden war.

Tabelle 7: Berechnete X^2- Werte für alle Zeitpunkte ab Woche 3 bis Woche 8, Vergleich PBS-Gruppe mit von AK0 Experiment 1. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Woche	**PBS**	**AK0**	**X^2-Wert**
1	0/5	0/6	-
2	0/5	0/6	-
3	2/5	0/6	2,93333333
4	3/5	2/6	0,7822222
5	4/5	2/6	2,39555556
6	4/5	2/6	2,39555556
7	4/5	3/6	1,06071429
8	4/5	5/6	0,02037037
9	5/5	6/6	-

Die errechnete Wahrscheinlichkeit liegt auch bei diesem Vergleich zu jedem Zeitpunkt unter dem Signifikanzniveau von 5%, so dass die Nullhypothese, die keinen Unterschied vermutet hatte, bestätigt ist. Somit ist laut Test die Diabetesentwicklung unabhängig von der Antikörperbehandlung mit AK0. Berechnet wurden ebenfalls die X^2-Werte ab Woche 3, da in Woche 1 und 2 noch keine Tiere erkrankt waren und somit kein Unterschied vorhanden war.

Tabelle 8: Berechnete X^2- Werte für alle Zeitpunkte ab Woche 4 bis Woche 8, Vergleich AK1-Gruppe mit AK0 von Experiment 1. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Woche	**AK1**	**AK0**	**X^2-Wert**
1	0/5	0/6	-
2	0/5	0/6	-
3	0/5	0/6	-
4	1/5	2/6	0,24444444
5	1/5	2/6	0,24444444
6	2/5	2/6	0,05238095
7	5/5	3/6	3,4375
8	5/5	5/6	0,91666667
9	5/5	6/6	-

Die errechnete Wahrscheinlichkeit liegt beim Vergleich der beiden Antikörper untereinander zu jedem Zeitpunkt unter dem Signifikanzniveau von 5%, so dass die Nullhypothese, die keinen Unterschied vermutet hatte, bestätigt ist. Somit ist laut Test die Diabetesentwicklung unabhängig von der Antikörperbehandlung. Die Werte wurden ab Woche 4 bis Woche 8 berechnet, da davor und danach gleich viele Tiere gesund bzw. erkrankt waren.

Der X^2-Test wurde auch für die Versuchsanordnung, bei dem die Tiere über 8 Wochen einmal pro Woche mit 100µg des Antikörpers behandelt wurden sind, berechnet.

Tabelle 9: Berechnete X^2- Werte für alle Zeitpunkte ab Woche 4 bis Woche 8, Vergleich AK1-Gruppe mit PBS von Experiment 2. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Wochen	**PBS**	**AK1**	X^2-Wert
1	0/5	0/5	-
2	0/5	0/5	-
3	1/5	0/5	-
4	1/5	0/5	1,1111111
5	1/5	2/5	0,476119048
6	2/5	3/5	0,4
7	2/5	4/5	1,66666667
8	4/5	4/5	1,11111111
9	5/5	5/5	-

Die errechnete Wahrscheinlichkeit des X^2-Tests liegt zu jedem Zeitpunkt unter dem Signifikanzniveau von 5%, so dass die Nullhypothese, die keinen Unterschied vermutet hatte, bestätigt ist. Somit ist laut Test die Diabetesentwicklung unabhängig von der Antikörperbehandlung mit Ak1.

3.4 Immunfluoreszenzhistologie

Die Immunfluoreszenzfärbung dient dazu, die Aktivität der T-Zellen in der Bauchspeicheldrüse diabetischer Tiere aus der Antikörperbehandlung mit den Kontrolltieren zu vergleichen.

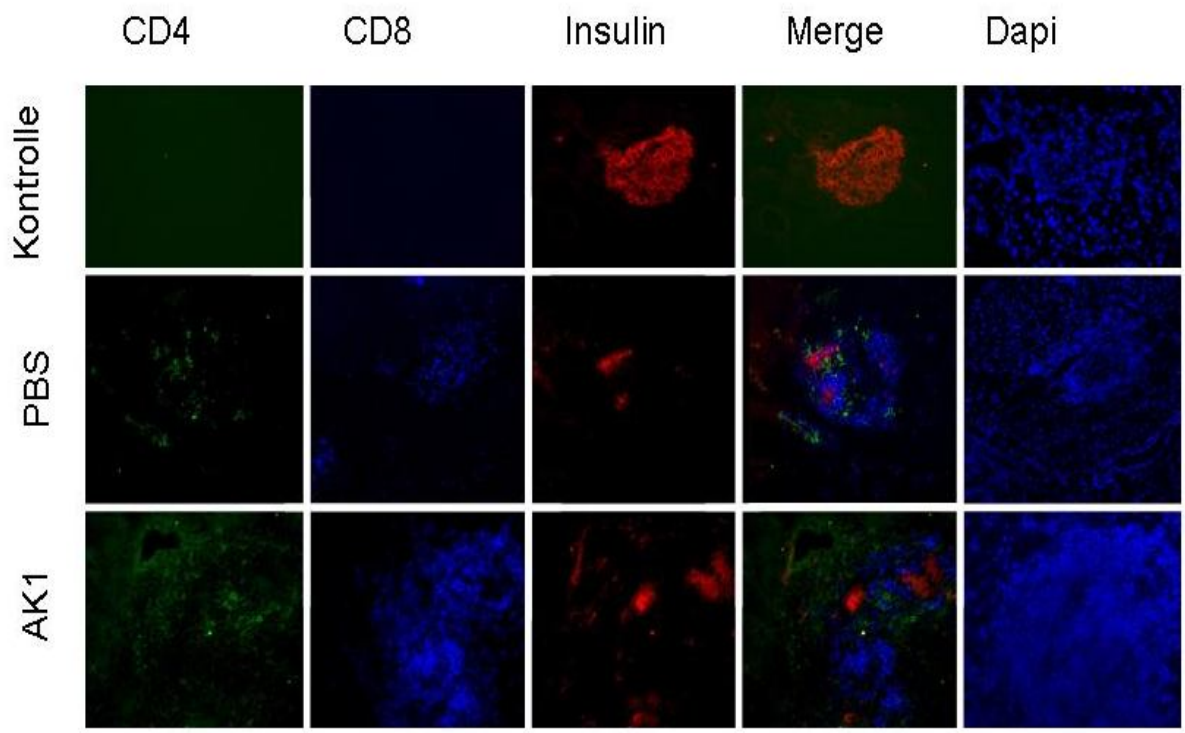


Abb. 10: Immunfluoreszensfärbung am Beispiel eines nicht diabetischen Kontrolltiers, sowie einer diabetischen PBS-Maus mit einer diabetischen AK1-behandelten Maus, Merge: alle Färbungen übereinander gelegt, Dapi: 4',6-Diamidin-2-phenylindol.

Man erkennt bei dem nicht diabetischen Kontrolltier eine deutlich höhere Insulinmenge in der Inselzelle. Nach Diabetesmanifestation ist im histologischen Schnittbild sowohl bei der diabetischen PBS-Maus als auch bei der mit AK1 behandelten Maus eine starke Infiltration von $CD4^+$- und besonders $CD8^+$-T-Zellen zu erkennen. Es lässt sich eine deutlich reduzierte Insulinmenge erkennen. Dies spricht in beiden Fällen für eine stattfindende Betazellzerstörung.

3.5 T-Zellanalyse der Peptidstimulation in der Milz mit B22 und B22-Mimo

Milzgewebe enthält T-Zellen, die durch Peptidstimulation zur Ausschüttung von Interferon-γ angeregt werden können. Um die T-Zell-Antworten zu studieren, erfolgte eine Stimulation mit B22 sowie B22-Mimo. Des Weiteren erfolgte eine Stimulation mit Ovalbumin als Kontrollpeptid. T-Zellen können zwar daran binden, es wird jedoch keine Antwort erzeugt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Peptidzugabe angefertigt.

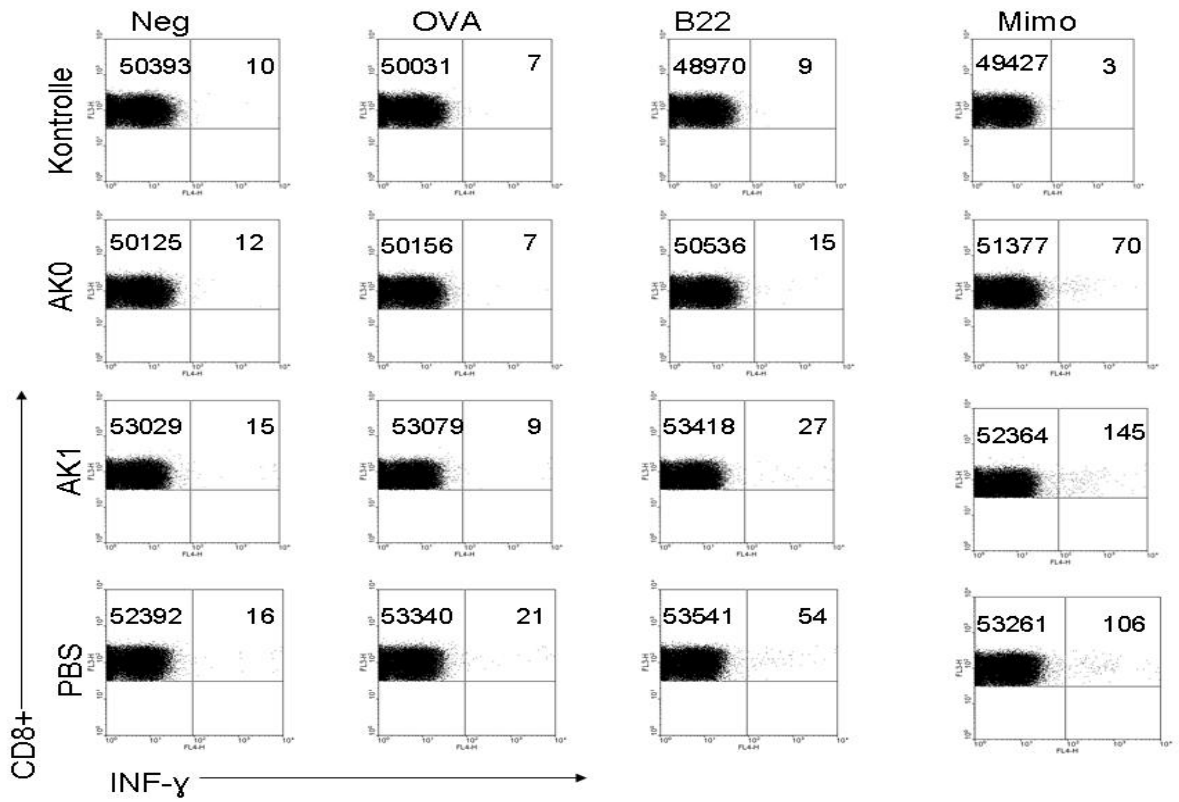


Abb. 11: Dot-Plot-Diagramme der Peptidstimulation des Milzgewebes von Tieren des Experiments 1 (300µg/5 Wochen), analysiert mit Durchflusszytometrie an Beispiel einer Kontrollmaus im Vergleich zu einem AK0//AK1/PBS-Tier, mit Stimulation durch Negativkontrolle(Neg), Ovalbumin(OVA), B22-Epitop(B22) sowie B22-Mimo(B22mimo). AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Im Dot-Plot-Diagramm von Experiment 1 (Abbildung 11) kann man erkennen, dass wie zu erwarten jeweils mit dem B22-Peptid sowie mit dem B22-Mimpeptid eine deutlich stärkere Stimulation der T-Zellen zu erzielen war als mit dem Kontrollpeptid OVA. In der Negativkontrolle gab es wie zu erwarten keine Stimulation. Die dennoch positiven Zellen können als übliche Hintergrundaktivität gewertet werden. Das Gatterfeld wurde so angelegt, dass im oberen rechten Quadranten die durch Peptid stimulierten $CD3^+$-/$CD8^+$-T-Zellen zu sehen sind. Man erkennt bei genauer Betrachtung des Dot-Plot-Diagramms nicht nur die größte Stimulation bei B22-Mimo, sondern auch einen Unterschied bei der Immunantwort zwischen dem Kontrolltier und dem mit Insulinantikörper behandelten Tier. Die stärkste Antwort weist die mit AK1 behandelte Maus auf, die Antwort bei PBS ist ein wenig geringer, die Antwort bei AK0 nur halb so stark. Dieser Versuch zeigt, dass die Bindung an das zu testende Peptid am stärksten war, dies wird durch die geringere Reaktion mit dem Kontrollpeptid verdeutlicht.

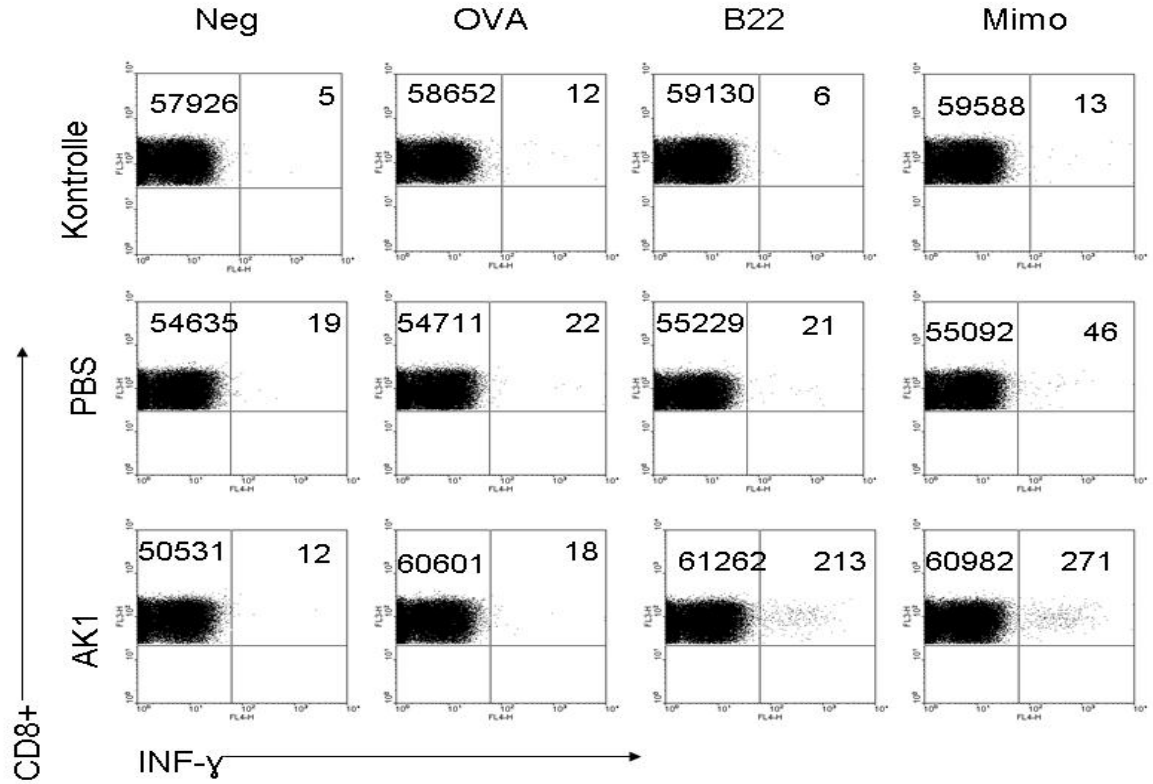


Abb. 12: Dot-Plot-Diagramme der Peptidstimulation des Milzgewebes von Tieren des Experiments 2 (100µg/8 Wochen), analysiert mit Durchflusszytometrie an Beispiel einer Kontrollmaus im Vergleich zu einem AK0//AK1/PBS-Tier, mit Stimulation durch Negativkontrolle(Neg), Ovalbumin(OVA), B22-Epitop(B22) sowie B22-Mimo(B22mimo). AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

In den Dot-Plot-Diagrammen von Experiment 2 (Abbildung 12) erkennt man wiederum bei allen Tieren die geringste Reaktion auf das falsche OVA-Peptid und die stärkste Antwort auf das B22-Mimotop. Auch bei dieser Versuchsanordnung reagiert das Versuchstier, dass mit AK1 behandelt wurden ist, am besten.

3.6 FACS-Daten zur Peptidstimulation

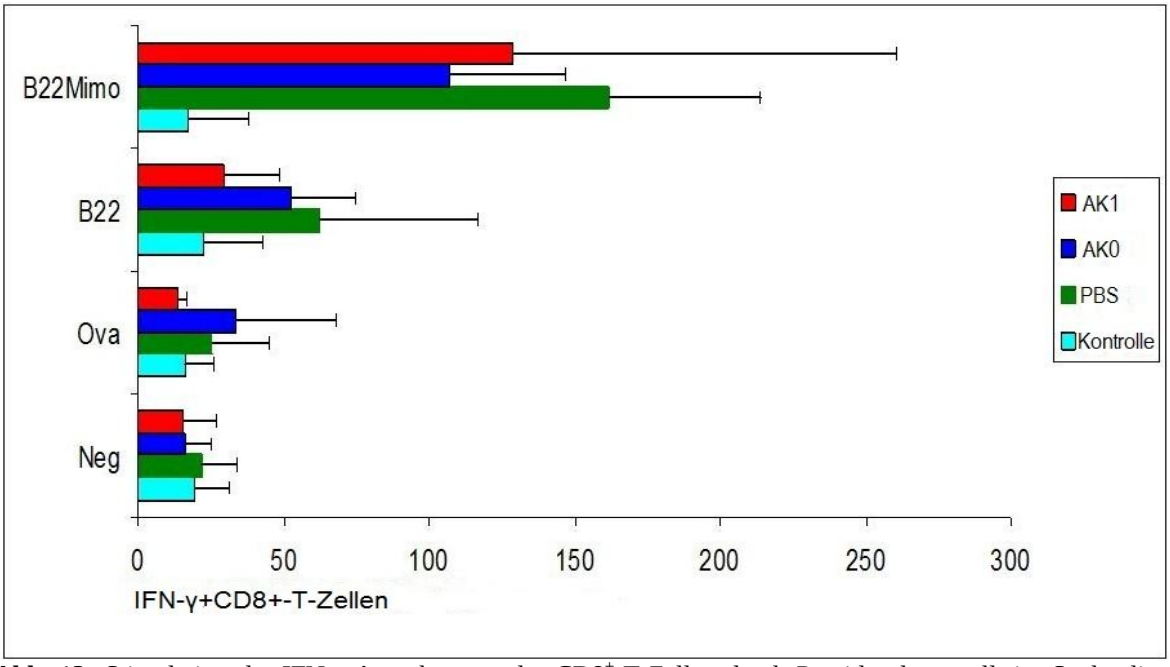


Abb. 13: Stimulation der IFN-γ-Ausschüttung der $CD8^+$-T-Zellen durch Peptide, dargestellt im Säulendiagramm, gerechnet auf 100.000 Zellen; Kontrolle n= 2, PBS: n= 3, Ak0: n= 3, Ak1: n= 3, 300 µg Antikörper/pro Woche/pro Tier für 5 Wochen. Neg: Negativkontrolle; OVA: Ovalbumin; B22:B22-Epitop. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Das Säulendiagramm in Abbildung 13 stellt die Ergebnisse der Peptidstimulation von Milzzellen der Versuchsreihe dar, bei der die Tiere fünf Wochen lang einmal pro Woche mit 300 µg des Antikörpers bzw. PBS behandelt worden sind. Es besteht ein großer Unterschied zwischen den Reaktionsstärken nach Stimulation mit Ovalbumin im Vergleich zum Insulinpeptid B22-Mimo. Die Reaktion fällt bei B22-Mimo deutlich höher aus. Bei der Negativkontrolle bleibt die Stimulation aus, die dargestellte Säule ist als Hintergrundaktivität anzusehen. Beim Kontrolltier ohne Behandlung und ohne DMT1 erkennt man die geringste Antwort auf Peptidstimulation, während bei den mit Insulinantikörper behandelten Tieren deutlich höhere Messwerte erhoben wurden. Am besten reagierten die Versuchstiere, die mit PBS und AK1 behandelt worden sind. Die T-Zellen der mit AK0 behandelten Tiere zeigten eine geringere IFN-γ-Produktion.

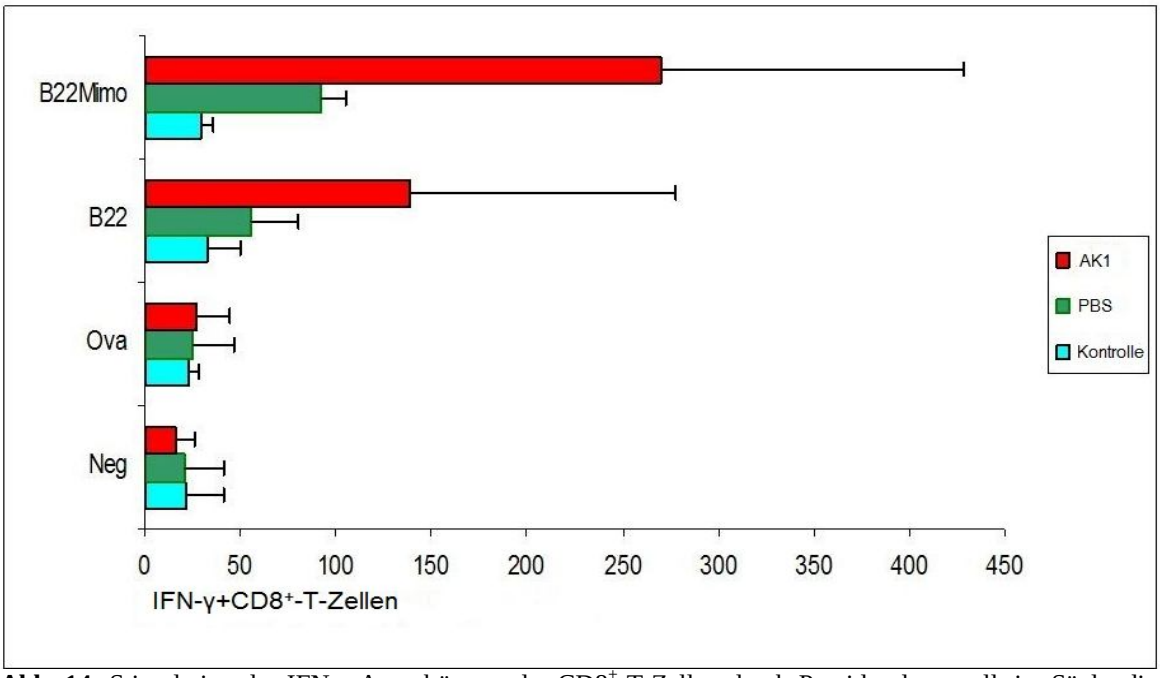


Abb. 14: Stimulation der IFN-γ-Ausschüttung der $CD8^+$-T-Zellen durch Peptide, dargestellt im Säulendiagramm, gerechnet auf 100.000 Zellen; Kon. = Kontrolle n=4, PBS: n= 2, Ak1: n= 4, gerechnet auf 100.000 Zellen, 100 µg Antikörper/pro Woche/ pro Tier für 8 Wochen. Neg: Negativkontrolle; OVA: Ovalbumin; B22:B22-Epitop. AK: Antikörper; PBS: Phosphate-bufferd saline.

Das Säulendiagramm in Abbildung 14 stellt die Ergebnisse der Peptidstimulation des Milzgewebes der Versuchsreihe dar, bei der die Tiere acht Wochen lang einmal pro Woche mit 100 µg des Antikörpers bzw. PBS behandelt worden sind. Auch bei dieser Grafik (Abbildung 13) lässt sich zeigen, dass die Zellen am besten auf B22-Mimo reagieren, während die Ovalbuminstimulation nur im mäßigen Grad erfolgt ist. Im Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsmethoden ist die stärkste Reaktion bei den AK1-Tieren zu erkennen.

3.7 Tetramerfärbung

Das Tetramer wurde konstruiert, um hochaffine T-Zellen für das B22-Mimoepitop (RGFFYTPL) zu detektieren. In den Dot-Plot-Diagrammen (Abbildung 14) der Tetramerfärbung erkennt man, sowohl beim Milz- als auch beim Bauchspeicheldrüsengewebe, dass die Tiere, die mit AK1 behandelt worden, mehr Tetramer-spezifische T-Zellen besitzen, während die Reaktion der spezifischen Zellen bei den Kontrolltieren geringer ausfällt.

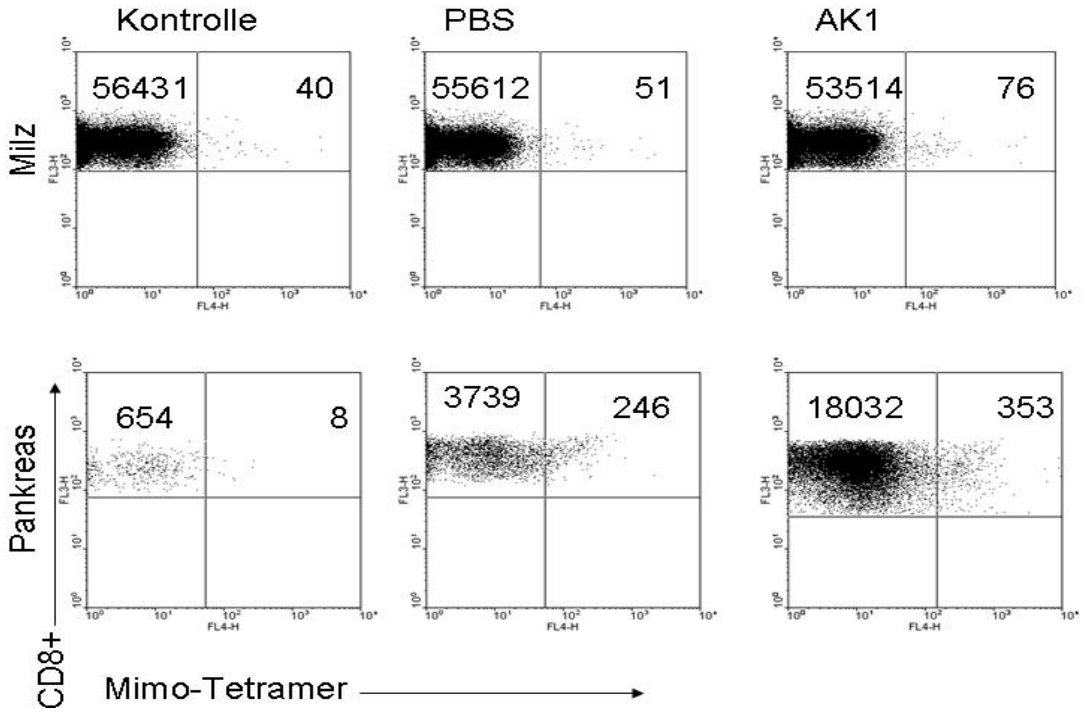


Abb. 15: Dot-Plot-Diagramme der Tetramerfärbung des Milz- sowie Bauchspeicheldrüsengewebes, analysiert mit Durchflusszytometrie an Beispiel einer Kontrollmaus im Vergleich zu einem PBS- und einem AK1-Tier. PBS: Phosphate-buffered saline.

Es fällt zusätzlich auf, dass bei der Tetramerreaktion in der Bauchspeicheldrüse eine beträchtlich intensivere Reaktion der Tetramer-spezifischen T-Zellen bei den AK1-Tieren und den PBS-Tieren im Vergleich zur Kontrolle stattgefunden hat.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Beginn und Verlauf des DMT1 durch eine Antikörpertherapie nicht in hohem Maße beeinflusst werden können, sich aber ein Trend in der immunmodulatorischen Wirkung erkennen lässt. Die statistisch berechneten Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Erkrankungsinzidenz zwischen den behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe. Auch wenn der X^2-Test nicht signifikant ausfiel, ist nicht komplett auszuschließen, dass die Antikörperbehandlung eine Veränderung der Immunantwort bewirken konnte. Die Plateauphasen der Inzidenzkurven kann man mit einer ablaufenden Immunreaktion interpretieren (Abbildung 7 und 8). Es ließ sich des Weiteren aus den Experimenten ableiten, dass eine hohe Dosierung des Antikörpers einen stärker verzögernd wirkenden Effekt auf die Immunantwort als eine niedrige Dosierung hatte. Bei der Peptidstimulation konnte gezeigt werden, dass die $CD8^+$-T-Zellen hochaffin auf das B22-Mimoepitop reagieren und dadurch zu einer vermehrten Interferon-γ-Ausschüttung angeregt werden. Die Tetramer war stark positiv für Tetramer-spezifische T-Zellen mit der Mimoepitopsequenz.

4. Diskussion

4.1 Darstellung der eigenen Ergebnisse

In dieser Pilotstudie wurde getestet, ob eine Therapie mit Insulinantikörpern eine Modulation der Immunantwort bei experimentellen DMT1 bewirken kann. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass durch die Antikörpertherapie die Diabetesentwicklung beim Versuchstier im Trend leicht verzögert wird, während das Ausmaß der zelluläre Immunität zum Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung nahezu unverändert ist. Normalerweise würde man annehmen, dass ein Antikörper, der gegen Insulin gerichtet ist, die Diabetesentwicklung beschleunigt. In diesem Fall sollte der Insulinantikörper jedoch das Gegenteil bewirken und die diabetischen Veränderungen verlangsamen. Durch welche Mechanismen die Antikörpertherapie klinisch wirksam sein könnte, ist nicht vollständig erklärbar. Vermutlich besitzt die Modifikation des Antikörpers mit Sialinsäure am Fc-Fragment eine immunmodulatorische Komponente. In einem Mausmodell zur Rheumatoiden Arthritis konnten deglykolisierte intravenöse Immunglobuline keinen antiinflammatorischen Schutz bieten (Gelfand 2012). Im Gegensatz dazu, konnten intravenöse Immunglobuline im akuten Schub der Entzündung die Menge an IgG-Molekülen mit einem hohen Anteil an Sialinsäure hochregulieren und somit die Inflammation durch nachfolgende Hochregulierung von inhibitorischen Rezeptoren dämpfen (Gelfand 2012). Aus dieser Studie lässt sich ableiten, dass eine präventive Antikörperapplikation einen sensibilisierenden Effekt auf die T-Zellen haben könnte und dass die Antikörperdosierung gegenüber der Dauer der Behandlung von größerer Bedeutung zu sein scheint. Diese Zusammenhänge hinsichtlich des strukturellen Aufbaus der Antikörper, der präventiven Antikörpergabe oder der Dosierung und Behandlungsdauer werden im Folgenden diskutiert. Zunächst wird auf die Ergebnisse der T-Zellanalysen eingegangen, um die Reaktion der hauptverantwortlichen Zellpopulation in der Pathogenese des DMT1 zu diskutieren. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass bei der Peptidstimulation mit B22-Mimo die größte Interferon-γ-Ausschüttung zu messen war und dass bei der Tetramerfärbung Tetramer-spezifische T-Zellen zu detektieren waren. Die Ergebnisse des X^2-Test fallen in der Berechnung bei beiden Versuchsanordnung (höhere Dosierung des Antikörpers oder längere Behandlungsdauer bei niedriger Antikörperdosis) nicht signifikant aus. Man muss jedoch bedenken, dass statistische Tests abhängig von der Fallzahl ausfallen und Fallzahlen bei einer Pilotstudie definitionsgemäß gering sind. Man sollte die Diabetesentwicklung in dieser Studie nicht als rein zufallsverteilt interpretieren. Die Plateauphasen in den Inzidenzkurven (Abbildung 7 und 8) liefern zumindest Hinweise, dass durch die Antikörper eine immunmodulatorische Veränderung

stattfindet. Wichtig ist es außerdem zu erwähnen, dass die Insulitis im B7.1-Mausmodell sehr aggressiv verläuft und deshalb dem beobachteten Trend der Verzögerung der Diabetesentwicklung eine große Beachtung geschenkt werden sollte.

4.2 T-Zellanalyse, Peptidbindung und Tetramerbindung

Der Großteil der Immunantwort bei DMT1 wird durch $CD8^+$-T-Zellen ausgelöst, so dass in den angewandten Versuchen auf diese Zellpopulation fokussiert wurde. Die Peptidstimulation zeigte bei den mit AK1 immunisierten Versuchstieren unter Stimulation mit B22-Mimo die größte Interferon-γ-Ausschüttung (Abbildung 12 und 13, Abschnitt 3.6). Dies liegt am strukturellen Aufbau des Mimotops und dem damit einhergehenden andersartigen Bindungsverhalten der letzten Aminosäure (Abschnitt 2.2). Bei der Tetramerfärbung konnte man die stärkste Reaktion im Bindungsverhalten zum Tetramer bei den mit AK1 immunisierten Mäusen beobachten. Bei den Kontrolltieren wurde lediglich eine unspezifische Hintergrundaktivität gemessen. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Antikörperbehandlung das Immunsystem anregt und die T-Zellen damit schon vorstimuliert sind. Damit wäre die verminderte Interferon-γ-Produktion bei den Kontrolltieren zu erklären. Das Tetramer hat, wie der Name schon sagt, vier Bindungsstellen mit der B22-Mimosequenz. Die höhere Anzahl an Bindungsstellen ist ähnlich stark wirksam wie eine längere Inkubationszeit bei der Peptidstimulation.

4.3 DNA- Immunisierung mit ppInsIIΔA12-21

Im EAD-Modell sind mittlerweile mehrere Epitopsequenzen auf der A- sowie auf der B-Kette des Insulingens bekannt, die nach Aufbereitung und Kodierung in Plasmiden DMT1 induzierend wirken. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ppInsIIΔA12-21 eine solche Sequenz ist. PpInsIIΔA12-21 bedeutet, dass an der A-Kette des Insulins eine Depletion der letzten 10 Aminosäuren vorgenommen wurde. Frühere Studien in diesem Labor konnten zeigen, dass das K^b/A12-21 Epitop der A-Kette diabetogene $CD8^+$-T-Zell-Antworten auslösen konnte (Brosi et al. 2009). Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass die immunogene Komponente auf dem PräproinsulinII-Gen gelegen ist (Boitrard et al. 2003; Thebault-Baumont et al. 2003; Moriyama et al. 2003), weswegen darauf fokussiert wird. In dieser Studie wurden durch Immunisierung mit ppInsIIΔA12-21 als Antigen Kb/B22-29-spezifische $CD8^+$-T-Zellen und EAD in RIP-B7.1 Mäusen induziert.

4.4 B22 Epitop und B22-Mimotop

Wie bereits in Abschnitt 4.3 dargestellt, wurden die T-Zellen in dieser Studie auf das K^b/B22-29-Epitop der B-Kette geprimed. K^b/B22-29 bedeutet, dass das Epitop an Position 22 der B-Kette des Insulin beginnt. Das Epitop ist ein Oktamer, da man erforscht hat, dass $CD8^+$-T-Zellen MHC-I-Epitope meistens in einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren binden (Kalergis 2000). MHC-I-Epitope haben oftmals eine nicht-polare Aminosäure an der letzten Position. B22 hat die Sequenz RGFFYTPM. Methionin an der letzten Position ist eine nicht-polare Aminosäure, die aufgrund eines Schwefelatoms in der Thioethergruppe der Seitenkette Bindungen durch Ausbildung von Disulfidbrücken erschweren kann, wie bereits in Abschnitt 2.3 erläutert. Trotzdem ergaben die FACS-Daten und die Dot-Plot-Analyse der Peptidstimulation, dass die T-Zellen gut mit dem B22-Epitop interagieren und durch dessen Stimulation zur Ausschüttung von Interferon-γ angeregt werden. Um dieses Bindungsverhalten noch effektiver zu gestalten, wurde Methionin an der letzten Stelle des Oktamers durch Leucin ersetzt. Die Sequenz von B22-Mimo ist demzufolge RGFFYTPL. Im Gegensatz zu Methionin besitzt Leucin trotz ansonsten ähnlichem Aufbau kein Schwefelatom, d.h. es bildet keine Disulfidbrücken aus. Dies führte zu einem erleichterten Bindungsverhalten und somit zu einer verstärkten IFN-γ-Produktion als beim „normalen" B22-Epitop, was in den Versuchen der Peptidstimulation bestätigt werden konnte (Abbildung 12 und 13, Abschnitt 3.6). Im Tetramerversuch wurde die B22-Mimosequenz getestet und es zeigte sich eine deutliche Zellaktivität der Tetramer-spezifischen Zellen. Eine Erklärung für das unterschiedliche Reaktionsverhalten auf B22 und B22-Mimo dürfte sein, dass B22 durch Möglichkeit der Disulfidbrückenbindung in der Lage ist Multimere zu bilden. So werden weniger Zellen stimuliert und es ergibt sich eine geringere Interferonantwort. Dies ist durch die Modifikation mit Leucin als letzter Aminosäure bei B22-Mimo nicht der Fall.

4.5 Therapieansatz mit Insulinantikörpern

Die Antikörpertherapie setzt am Hauptantigen Insulin an und kann durch die spezifische Modifikation mit Sialinsäure die Immunantwort modulieren. Aufgrund der besonderen Struktur des Antikörpers, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, wird die Immunantwort schwächer ausgelöst, da der zytotoxischen T-Zelle die zur Aktivierung benötigten Kommunikationssignale nicht weitergeleitet werden. Man kann vermuten, dass die Struk-

tur des Antikörpers eine immunomodulatorische Wirkung zeigt. Die mit AK1 behandelten Tiere zeigten eine verlangsamte Entwicklung des DMT1. Mit welchen molekularen Mechanismen diese verminderte Zellsignalvermittlung einhergeht bleibt noch näher zu erforschen. Ein Ansatz wäre, dass die Bindungsaffinität der APC zum Antigen-Antikörperkomplex durch den hohen Anteil an Sialinsäure deutlich reduziert wird. Möglich ist auch, dass die APC das Antigen nicht erkennen, da es durch den Antikörper maskiert wird. Ein wichtiger Aspekt ist, dass es eventuell zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung Treg-Zellen kommt. Dies führt zu einer geringeren Zahl zytotoxischer T-Zellen und als Folge zu einer langsameren Krankheitsprogression. Auch könnte man darüber nachdenken, ob die Behandlung mit einer hohen Dosis des Antikörpers oder eine Behandlung über einen längeren Zeitraum die T-Zellen im Sinne einer Sensibilisierung in Anergie versetzen kann.

4.6 Präventive Antikörpergabe

Der Studienansatz sah vor, dass die erste Gabe der Antikörper vor der DNA- Impfung und damit vor dem Primen der T-Zellen stattfand. Es handelte sich somit um einen präventiven Ansatz. Dieser wurde gestützt durch klinische Befunde, dass Mütter während der Schwangerschaft IgG-Moleküle transplazentar auf ihren Fetus übertragen können. Dadurch erhält das Ungeborene bereits im Mutterleib eine passive Immunität gegenüber einigen Erkrankungen. Studien bestätigten, dass auch Inselzellantikörper diaplazentar von der Mutter auf das Kind übertragen werden können (Ziegler et al. 1993; Roll et al. 1996). Des Weiteren zeigten andere Studien, dass das Risiko an Diabetes zu erkranken bei einem an Diabetes erkrankten Vater dreimal höher ist als bei einer an Diabetes erkrankten Mutter (Warram et al. 1984; Pociot et al. 1993; Yu et al. 1995). Dies lässt vermuten, dass es schützende Mechanismen gibt, die während der Schwangerschaft entstehen. Dieser Schutz könnte dadurch entstehen, dass es z. B. eine bessere Elimination der autoreaktiven T-Zellen durch die Antikörper vermittelte Präsentation des Autoantigens während Fetal- und Neonatalzeit gibt. Es könnte eine immunologische Ignoranz durch Blockieren / Maskieren der relevanten Autoantigenpeptide erfolgen (Kurts et al. 1999). Es gibt Therapieansätze, die eine prophylaktische Behandlung mit Insulin selbst vorsehen (Gotfredsen et al. 1985). Im Tiermodell des DMT1 konnte die Immunantwort durch Gabe von Inselzellantigenen moduliert werden. Immunisierung mit Insulin oder GAD-65 zu einem früheren Zeitpunkt konnte den Krankheitsverlauf verzögern und präventiv dem Ausbruch entgegenwirken (Kaufman et al.

1993; Muir et al. 1995; Daniel et al. 1996; Karounos et al. 1997). Man geht heutzutage davon aus, dass der funktionelle Zustand der Betazellen Einfluss auf den Ausbruch des Diabetes hat und dass aktivierte Betazellen anfälliger für Autoimmunmechanismen sind als metabolisch weniger belastete Zellen. Entsprechend der Feedback-Inhibierung hormoneller Regelkreise führt die exogene Administration eines Hormons durch Rückkopplung zur verringerten endogenen Produktion. Bezogen auf die Bauchspeicheldrüse bedeutet das eine geringere Insulinproduktion mit Folge des Beta-Zell-Arrests, womit ein protektives Niveau erreicht werden kann. Dieser Therapieansatz wurde im „Diabetes Prevention Trial for Type 1 Diabetes“ getestet (Johnson et al. 2007). Hier wurden Inselzellantikörper-positive Verwandte von Patienten mit DMT1 mit einer parenteralen Insulintherapie behandelt. In dieser Studie konnte jedoch die parenterale Gabe den Ausbruch nicht verhindern oder verzögern. Eine große Schwierigkeit dieses Therapieansatzes stellt die Dosierung des Insulins dar, da ein schmaler Grat zwischen der wirksamen Dosis und der Induktion von Hypoglykämien besteht. Außerdem muss bedacht werden, dass nur ein Teil des Insulins nach Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum von den Antigen-präsentierenden Zellen an die T-Zelle präsentiert wird, so dass man mit einer Insulintherapie nicht spezifisch an der Ursache des DMT1 angreift, sondern nur eine Konsequenz der trotzdem vorhandenen Autoimmunität therapiert.

4.7 Dosierung des Antikörpers und Behandlungsdauer

In zwei verschiedenen Experimenten wurde in dieser Studie getestet, ob die Dosis oder die Behandlungsdauer einen stärkeren Einfluss auf den Ausbruch bzw. die Verzögerung des DMT1 hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörpertherapie mit einer höheren Konzentration als effektiver anzusehen ist, als eine Behandlung über einen längeren Zeitraum. Es lässt sich vermuten, dass eine hohe Konzentration des Antikörpers und eine ausreichend lange Behandlungsdauer ihre Wirkung im Sinne einer Sensibilisierung zeigt. Ständige Exposition mit einem Antigen kann T-Zellen in Anergie versetzen und sie somit unfähig für eine adäquate Immunantwort machen. Dieses Prinzip macht man sich heute bei Allergien im Rahmen der Hyposensibilisierung zu nutze. Auch wäre denkbar, dass die Antikörper Antigene neutralisieren und deren Zugänglichkeit für das Immunsystem maskieren. Dies wäre bei einer hohen Dosierung denkbar. In den Versuchen zeigte sich, dass die höhere Dosierung mit 300 µg besser geeignet ist ein immunmodulatorisches Phänomen zu bewirken. Dies könnte im Falle des Antikörpers mit hohem Silalinsäuregehalt daran liegen, dass

die Struktur der Zuckerkette die Halbwertszeit mitbestimmt. Ein hoher Anteil bedingt daher eine hohe Halbwertzeit. Es gibt Studien, die im Tiermodell durch DNA-Immunisierung mit Insulin versuchten den Autoimmunprozess zu stoppen (Coon et al. 1999). Das Immunsystem erhält durch mehrfache Immunisierung „boosts“, durch die sich die Zelle an das Antigen gewöhnt. Die Gefahr hierbei ist, dass es T-Zellen geben kann, die der negativen Selektion entkommen sind und man diesen Pool an potenziellen autoreaktiven T-Zellen nicht komplett ausschalten kann.

4.8 Antikörper und Sialinsäure

Beim Verlauf der Inzidenzkurven konnte man leichte Unterschiede zwischen den mit AK0 und AK1 behandelten Tieren erkennen. Dieser Unterschied ist vermutlich durch den strukturell andersartigen Aufbau der Antikörper zu erklären. Der Unterschied zwischen AK1 und AK0 bestand darin, dass AK1 mit 50% Sialinsäure am Fc-Fragment versehen wurde, während AK0 keine Sialinsäure enthielt. Sialinsäuren sind negativ geladene Monosaccharide. Sie befinden sich meist freiliegend an terminalen Enden von Aminozuckern an Glykoproteinen der Zelloberfläche und sind für Zell-Zell-Interaktionen von Bedeutung (Sonnenburg et al. 2004). Der häufigste Vertreter ist die N-Acetylneuraminsäure (Angata et Varki 2002; Traving et Schauer 1998; Troy 1992). Sialinsäure kann durch Ladungsabstoßung oder Maskierung aufgrund Cis-Konformationsänderungen Zell-Zell-Interaktionen negativ im Sinne einer Blockierung bzw. Abschwächung beeinflussen (Crocker et Varki 2001). Somit könnten diese Moleküle Ziel einer immunmodulatorischen Therapie sein. Antikörper, die mit einem geringen Anteil an Sialinsäure am Aminozuckerrest versehen wurde (AK0), würden eine stärkere Immunantwort bewirken als solche, bei denen der Anteil an Sialinsäure sehr hoch ist (AK1). Im Verlauf der Inzidenzkurve der mit AK1 behandelten Tiere in jeweils beiden Versuchsgruppen erkennt man eine Plateauphase, die gleichzusetzen ist mit einer in diesem Zeitraum stattfindenden Immunantwort (Abbildung 7 und 8, Abschnitt 3.1). Daraus könnte man schließen, dass die Menge an Sialinsäure die Affinität der zytotoxischen T-Zellen beeinflusst. Eine Erhöhung des Sialinsäureanteils am Antikörper kann durch Verringerung der Zell-Zell-Kommunikation zwischen APC und T-Zelle zu einer geringeren Immunantwort führen.

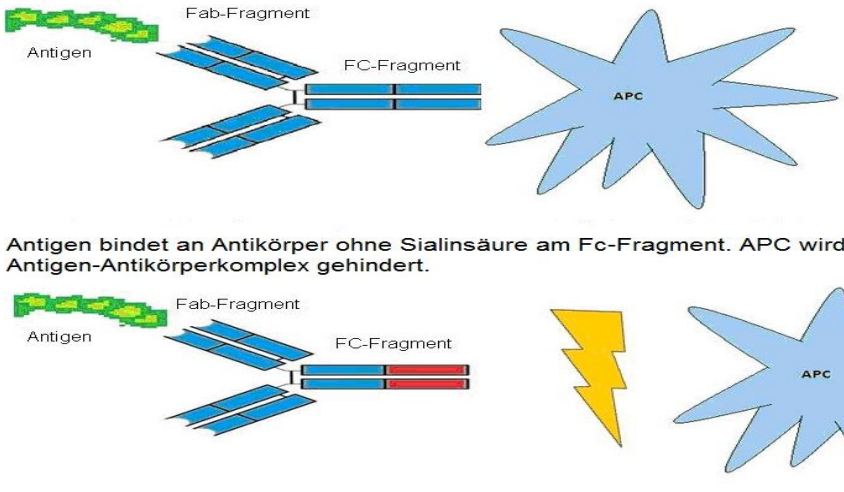


Abb. 16: APC-Aktivierung / Blockade durch Variation des Sialinsäuregehalts am Fc-Rezeptor des Antikörpers. APC: Antigen-präsentierende Zelle.

In einer Studie wurde festgestellt, dass die Aktivierung der B-Zellen über CD22 stärker wurde, sobald die Bindungsstellen durch Behandlung mit Neuramidase (Enzym, das Sialinsäure abbaut) desialisiert wurden (Razi et Varki 1999). Weiter unterstützend für diese Theorie ist der Mechanismus bei einer Influenza-Infektion, bei der Sialinsäuren eine wichtige Funktion im Pathomechanismus übernehmen. Der Virusbefall führt in der Zelle zu einer Minimierung der Sialinsäuremenge an der Zelloberfläche, so dass die Immunantwort stärker wird. Sialinsäuren sind evolutionsbiologisch sehr „alte“ Strukturen. Sie binden meist an sogenannte Siglecs, „sialic acid binding Ig-like lectins“. Dies sind spezifische Rezeptoren, die auf B-Zell-Ebene weit erforscht sind. Die Bindung erfolgt an der N-terminalen V-Domäne des Rezeptors (Angata et Brinkman-Van der Linden 2002; Crocker et Varki 2001). Diese Bindungsstelle des Siglecs kann durch Cis-Interaktionen (Konformationsänderung in der Bindungsstelle) mit Sialinsäure maskiert werden, so dass es zu keiner Zell-Interaktion oder – Aktivierung kommt (Crocker et Varki 2001). Bei den T-Zellen sind Siglecs noch wenig erforscht, jedoch ist anzunehmen, dass die immunomodulatorische Funktion der Sialinsäure über den T-Zell-Rezeptor auf dem gleichen Prinzip wie in der B-Zell-Reihe basiert. Diese Maskierung ist ein Phänomen, das auf fast allen inaktiven Blutzellen zu finden ist (Razi et Varki 1999). Vermutlich ist genau diese Beeinflussung der Zellaffinität der entscheidende Faktor dafür, dass die AK1- behandelten Mäuse zumindest einen späteren Krankheitsausbruch im Vergleich zu den AK0- und PBS-Tieren zeigten. Eine weitere Überlegung zu der Wirkweise der Sialinsäureinteraktion stellten R. Anthony und J. Ravetch im Jahr 2010 an. Sie zeigten in einer Studie, dass Antikörper mit hohem Sialinsäuregehalt am Fc-Rezeptor nicht nur das Bindungsverhalten stark herabsetzen, son-

dern über Bindung am Lectin-Rezeptor SIGN-RI eine antiinflammatorische Reaktion auslösen können. Diese führt zur Hochregulation von inhibitorischen Fc-Rezeptoren und bewirkt eine Abschwächung der Antikörper vermittelten Reaktion (Anthony et Ravetch 2010).

4.9 Ausblick und Perspektiven

Toleranz, Immunität sowie Autoimmunität sind aktive Vorgänge im Immunsystem. Durch das Zusammenwirken von Immunzellen, Antikörpern und Antigenen entsteht ein Netzwerk an möglichen Immunreaktionen auf verschiedenste Situationen. Eine Hoffnung, dass in Zukunft eine Insulinantikörpertherapie beim Menschen wirksam sein könnte, stützt sich auf die Immun-Netzwerk-Theorie von Niels K. Jerne, bereits aufgestellt im Jahre 1974. Diese beruht auf der Tatsache, dass Antikörper komplementär zu dem sie aktivierenden Antigen sind und somit ein „anti-image“ des Antigens bilden. Dieses „anti-image“ kann selbst als Antigen eine neue Gruppe Antikörper induzieren, von denen einige komplementär zur antigen-bindenen Oberfläche sind. Dieses Komplement vom Komplement bezeichnet Jerne als „internal image“ des Antigens. Es werden sozusagen während des Ablaufs der Immunantwort im Wechsel „images“ und „anti-images“ des Antigens produziert, wobei nur die „anti-image“- Antikörper auf ein Antigen reagieren. In der ersten Phase dieser Antwort erhält man Antikörper gegen das ursprüngliche Antigen, in der zweiten Phase Antikörper, die nicht mit dem ursprünglichen Antigen in Bezug stehen. In der dritten Phase werden wieder Antikörper produziert, die in Bezug zu Antikörpern der ersten Phase stehen, dennoch nicht das ursprüngliche Antigen erkennen können. "Anti-image“- Antikörper können an die Immunrezeptoren der z.B. B-Zellrezeptoren, die auf das ursprüngliche Antigen reagieren, binden und die Immunantwort auf dieses Antigen inhibieren. Diese Netzwerktheorie ist ein Ansatz, den Ablauf einer Immunantwort zu erklären. Fraglich ist, ob genau diese Mechanismen auch bei einer Insulinantikörpertherapie ablaufen würden. Letztlich bleibt zu klären, wie gut man die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse bezüglich der Insulinantikörpertherapie auf den Menschen übertragen kann. Es gibt viele Unterschiede zwischen Mensch und Maus, aber einige Kernfaktoren des Krankheitsbilds DMT1 sind bei beiden Organismen identisch und in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 10: Wichtige Gemeinsamkeiten des Diabetes mellitus Typ 1 bei Mensch und Maus.

Maus	**Mensch**
Insulin als Hauptantigen	Insulin als Hauptantigen
Insulitis im Pankreas	Insulitis im Pankreas
T-Zell-vermittelte Erkrankung	T-Zell-vermittelte Erkrankung
Insulinantikörpertherapie wirksam	Insulinantikörpertherapie wirksam?

Trotz dieser Gemeinsamkeiten sollte man einige Faktoren beachten, die im Mausmodell nicht berücksichtigt werden können, wie den Einfluss von genetischen Risikomerkmalen und den Einfluss von Umweltfaktoren. Diesen Faktoren wird in der Literatur oftmals eine große Bedeutung beigemessen, bei der Haltung der Labortiere unter keimfreien Bedingungen jedoch werden sie ausgeklammert. Selbst wenn statistisch der Unterschied zwischen den Kontrolltieren und Mäusen, die mit den Antikörpern behandelt wurden, nicht signifikant war, ist eine Tauglichkeit im Ansatz dieser Studie zu erkennen. Es ist zu überdenken, die Pilotstudie mit einer größeren Anzahl an Versuchstieren zu wiederholen, um eine eventuell doch vorhandene Signifikanz zu bestätigen.

Auch müsste in einer weiteren Studie die Aspekte Dosierung und Halbwertszeit der Antikörper näher betrachtet werden, vor allem um etwaige Nebenwirkungen oder gar Toxizität der Therapie zu minimieren.

5. Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 1 entwickelt sich aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Das eingesetzte Modell des experimentellen Autoimmundiabetes ähnelt hinsichtlich vieler Faktoren der Erkrankung beim Menschen und kann deswegen für präklinische Studien effektiv genutzt werden. Diese Pilotstudie testete mit Hilfe des Modells des experimentellen Autoimmundiabetes an Mäusen, ob eine Insulinantikörpertherapie einen immunmodulatorischen Effekt auf den Verlauf von Diabetes mellitus Typ 1 haben könnte.
Die Ergebnisse zeigen, dass die Immunmodulation mit Insulinantikörpern im Mausmodell einen verzögerten Verlauf der Krankheit erreichen könnte. Getestet wurden zwei strukturell unterschiedliche Antikörper, die in verschiedenen Dosierungen und über verschiedene Zeiträume appliziert wurden. Der entscheidende Faktor für die Wirksamkeit ist vermutlich der Sialinsäuregehalt am Fc-Fragment des Antikörpers, der in Abhängigkeit von seiner Konzentration die Zell-Zell-Interaktionen beeinflusst und die Immunantwort verändern kann. Des Weiteren konnten mittels Peptidstimulation und Tetramerfärbung das Epitop B22 sowie das Mimotop B22 als wichtige Epitope in der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 1 charakterisiert werden. Es wurde bestätigt, dass Präproinsulin ΔA12-21 als Autoantigen bei der Immunisierung im Modell des experimentellen Autoimmundiabetes fungieren kann und dieses für das Epitop B22 spezifische $CD8^+$-T-Zellen induziert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das Epitop B22 mit einer Veränderung zum Mimotop B22 an der letzten Stelle der Aminosäuresequenz zu einer noch stärkeren Interferon-γ-Produktion führen kann. Diese Studie deutet an, dass die Behandlung mit Insulinantikörpern in einer höheren Dosierung der Antikörper effektiver als eine längere Behandlungsdauer zu sein scheint. Bezüglich der Dosierung und der Halbwertszeit des Antikörpers müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um eventuell auftretende Nebeneffekte zu minimieren oder gar zu vermeiden. Verglichen mit einer Insulintherapie des Diabetes mellitus Typ 1 wäre eine Therapie mit Insulinantikörpern hinsichtlich der Tatsache überlegen, dass hierbei nicht die Konsequenz der Autoimmunerkrankung behandelt, sondern die Ursache der Erkrankung direkt angegangen werden würde. Dies hätte zudem den Vorteil einer hochselektiven Immunsuppression, da der Antikörper direkt gegen das auslosende Antigen gerichtet ist. Übertragen auf den Menschen könnte eine Therapiestrategie mit chimären zum Beispiel humanisierten murinen Antikörpern ähnlich gute Ergebnisse erzielen wie bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen überzeugend gezeigt wurde. Inwieweit die präventive Antikörpergabe in Risikogruppen (familienassoziiertes Risiko, genetische Veranlagung) durchgeführt werden könnte, lässt sich aktuell nicht abschätzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB: T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat Rev Immunol 1: 220-228 (2001)

2. Angata T, Brinkman-Van der Linden E: I-type lectins. Biochim Biophys Acta 1572: 294-316 (2002)

3. Angata T, Varki A: Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto-acids: an evolutionary perspective. Chem Rev 102: 439-469 (2002)

4. Anthony RM, Ravetch JV: A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-Inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. J Clin Immunol 30 Suppl 1: S9-14 (2010)

5. Boettler T, von Herrath M: Protection against or triggering of Type 1 diabetes? Different roles for viral infections. Expert Rev Clin Immunol 7: 45-53 (2011)

6. Boitard C, Yasunami R, Dardenne M, Bach JF: T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. J Exp Med 169: 1669-1680 (1989)

7. Brosi H, Reiser M, Rajasalu T, Spyrantis A, Oswald F, Boehm BO, Schirmbeck R: Processing in the endoplasmic reticulum generates an epitope on the insulin A chain that stimulates diabetogenic CD8 T cell responses. J Immunol 183: 7187-7195 (2009)

8. Burster T, Boehm BO: Processing and presentation of (pro)-insulin in the MHC class II pathway: the generation of antigen-based immunomodulators in the context of type 1 diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev 26: 227-238 (2010)

9. Buschard K: What causes type 1 diabetes? Lessons from animal... [APMIS Suppl. 2011] - PubMed - NCBI. . Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615797 [10/3/2011, 2011]

10. Coon B, An LL, Whitton JL, von Herrath MG: DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. J Clin Invest 104: 189-194 (1999)

11. Crocker PR, Varki A: Siglecs in the immune system. Immunology 103: 137-145 (2001)

12. Daniel D, Wegmann DR: Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). Proc Natl Acad Sci USA 93: 956-960 (1996)

13. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: recent developments. Brit Med Journal, 328: 750-754 (2004)

14. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P: Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulitis in recent-onset type 1 diabetic patients. Proc Natl Acad Sci USA 104: 5115-5120 (2007)

15. Gelfand, EW: Intravenous immuner globuline ion autoimmune and inflammatory Diseases. N Engl J Med 367: 2015-25 (2012)

16. Giani, G, Janka, HU, Hauner, H, Standl, E. Schiel, R. Neu, A. Rathmann, W. Rosenbauer, J: Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland [Homepage of Scherbaum, W.A. Lauterbach, K.W. Renner, R.], [Online] 05/04- Last update. Available: http://www. Deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/ mitteilungen/leitlinien/EBL_Epidemiologie_Update_2004.pdf [13.08.2011, 2011]

17. Gotfredsen CF, Buschard K, Frandsen EK: Reduction of diabetes incidence of BB Wistar rats by early prophylactic insulin treatment of diabetes-prone animals. Diabetologia 28: 933-935 (1985)

18. Holterhus P, Beyer P, Bürger-Büsing J, Danne T, Etspüler J, Heidtmann B, Holl R, Karges B, Kiess W, Knerr I, Kordonouri O, Lange K, Lepler R, Marg W, Näke A, Neu A, Petersen M, Podeswik A, von Sengbuasch S, Stachow R, Wagner V, Ziegler R: , Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Kindes-und Jugendalter. [Homepage of Deutsche Diabetes Gesellschaft], [Online] 11.03.2009, 2009-last update. Available: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft,de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/ EBL_Kindesalter_2010.pdf

19. Hyoty H, Taylor KW: The role of viruses in human diabetes. Diabetologia 45: 1353-1361 (2002)

22. Jameson, J. Larry Kasper, Dennis Fauci, Anthony Braunwald, Eugene Longo, Dan Hauser, Stephen: Chapter 19- Diabetes mellitus-Epidemiology
. In: Jameson J L (Hrsg) Harrison's Endocrinology, Bd 1, second edtion, McGraw-Hill Companies, Columbus, Ohio, Amerika, S. 269-270 (2010)

23. Jerne NK: Idiotypic networks and other preconceived ideas. Immunol Rev 79: 5-24 (1984)

24. Johnson SB, Baughcum AE, Hood K, Rafkin-Mervis LE, Schatz DA, DPT-1 Study Group: Participant and parent experiences in the parenteral insulin arm of the diabetes prevention trial for type 1 diabetes. Diabetes Care 30: 2193-2198 (2007)

25. Kalergis AM, Nathenson SG: Altered peptide ligand-mediated TCR antagonism can be modulated by a change in a single amino acid residue within the CDR3 beta of an MHC class I-restricted TCR. J Immunol 165: 280-285 (2000)

26. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV: Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 313: 670-673 (2006)

27. Karges W, Pechhold K, Al Dahouk S, Riegger I, Rief M, Wissmann A, Schirmbeck R, Barth C, Boehm BO: Induction of autoimmune diabetes through insulin (but not GAD65) DNA vaccination in nonobese diabetic and in RIP-B7.1 mice. Diabetes 51: 3237-3244 (2002)

28. Karges W, Rajasalu T, Spyrantis A, Wieland A, Boehm BO, Schirmbeck R: The diabetogenic, insulin-specific CD8 T cell response primed in the experimental autoimmune diabetes model in RIP-B7.1 mice. Eur J Immunol 37: 2097-2103 (2007)

29. Karounos DG, Bryson JS, Cohen DA: Metabolically inactive insulin analog prevents type I diabetes in prediabetic NOD mice. J Clin Invest 100: 1344-1348 (1997)

30. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. Nature 366: 69-72 (1993)

31. Kerner W Brückel, J.: , Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. [Homepage of Kellerer, M. Matthaei, S. Thiemeverlag im Auftrag der DDG], [Online] 10/2011, 2011-last update. Available: http: // www. deutsche-Diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Praxisleitlinien/PL_ DDG2011_Def_Klass_u_Diagnostik_des_DM.pdf [01.05.2012, 2012]

32. Keyser FD: Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective Curr. Rheumatol Rev 7: 77-87 (2011)

33. Klinke DJ, 2nd: Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. PLoS One 3: 1374 (2008)

34. Kurts C, Sutherland RM, Davey G, Li M, Lew AM, Blanas E, Carbone FR, Miller JF, Heath WR: CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. Proc Natl Acad Sci .USA 96: 12703-12707 (1999)

35. Madec AM, Rousset F, Ho S, Robert F, Thivolet C, Orgiazzi J, Lebecque S: Four IgG anti-islet human monoclonal antibodies isolated from type 1 diabetes patients recognize distinct epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and are somatically mutated. J Immunol 156: 3541-3549 (1996)

36. Matsumoto A, Shikata K, Takeuchi F, Kojima N, Mizuochi T: Autoantibody activity of IgG rheumatoid factor increases with decreasing levels of galactosylation and sialylation. J Biochem 128: 621-628 (2000)

37. Moriyama H, Abiru N, Paronen J, Sikora K, Liu E, Miao D, Devendra D, Beilke J, Gianani R, Gill RG, Eisenbarth GS: Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse. Proc Natl Acad Sci USA 100: 10376-10381 (2003)

38. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N: Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. J Clin Invest 95: 628-634 (1995)

39. Palmer E: Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell Repertoire. Nat Rev Immunol 3: 383-391 (2003)

40. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K: Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. Nature 316: 452-457 (1985)

41. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G, EURODIAB Study Group: Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. Lancet 373: 2027-2033 (2009)

42. Pociot F, Norgaard K, Hobolth N, Andersen O, Nerup J: A nationwide population-based study of the familial aggregation of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Denmark. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. Diabetologia 36: 870-875 (1993)

43. Rajasalu T, Barth C, Spyrantis A, Durinovic-Bello I, Uibo R, Schirmbeck R, Boehm BO, Karges W: Experimental autoimmune diabetes: a new tool to study mechanisms and consequences of insulin-specific autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 1037: 208-215 (2004)

44. Razi N, Varki A: Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. Glycobiology 9: 1225-1234 (1999)

45. Richter W, Jury KM, Loeffler D, Manfras BJ, Eiermann TH, Boehm BO: Immunoglobulin variable gene analysis of human autoantibodies reveals antigen-driven immune response to glutamate decarboxylase in type 1 diabetes mellitus. Eur J Immunol 25: 1703-1712 (1995)

46. Roep BO: Islet autoreactive CD8 T-cells in type 1 diabetes: licensed to kill? Diabetes 57: 1156 (2008)

47. Roll U, Christie MR, Fuchtenbusch M, Payton MA, Hawkes CJ, Ziegler AG: Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents. The German Multicenter BABY-DIAB study: detection of humoral immune responses to islet antigens in early childhood. Diabetes 45: 967-973 (1996)

48. Shevach EM: CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol 2: 389-400 (2002)

49. Sonnenburg JL, Altheide TK, Varki A: A uniquely human consequence of domain-specific functional adaptation in a sialic acid-binding receptor. Glycobiology 14: 339-346 (2004)

50. Strachan D: Hay fever, hygiene, and household size. British Medical Journal 299: 1259-1260 (1989)

51. Thebault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, Morin J, Laloux V, Lehuen A, Carel JC, Jami J, Muller S, Boitard C: Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient

NOD mice. J Clin Invest 111: 851-857 (2003)

52. Traving C, Schauer R: Structure, function and metabolism of sialic acids. Cell Mol Life Sci 54: 1330-1349 (1998)

53. Troy F A, 2nd: Polysialylation: from bacteria to brains. Glycobiology 2: 5-23 (1992)

54. Tsai S, Shameli A, Santamaria P: CD8+ T cells in type 1 diabetes. Adv Immunol 100: 79-124 (2008)

55. Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR: Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. N Engl J Med 311: 149-152 (1984)

56. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG: Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. Clin Exp Immunol 155: 173-181 (2009)

57. Yu L, Chase HP, Falorni A, Rewers M, Lernmark A, Eisenbarth GS: Sexual dimorphism in transmission of expression of islet autoantibodies to offspring. Diabetologia 38: 1353-1357 (1995)

58. Ziegler AG, Hillebrand B, Rabl W, Mayrhofer M, Hummel M, Mollenhauer U, Vordemann J, Lenz A, Standl E: On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. Diabetologia 36: 402-408 (1993)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- Meinem Doktorvater Professor Dr. Bernhard O. Böhm dafür, dass er mir die Möglichkeit zur Dissertation in dem spannenden Fachgebiet der Endokrinologie und dass er mir stets sehr gute Vorschläge und Anleitungen zum konstruktiven und erfolgreichen Arbeiten gegeben hat.
- Herrn Doktor Andreas Spyrantis, der ein exzellenter Betreuer meiner Arbeit war, der zu fast jeder Tageszeit erreichbar war und mir sehr viel beigebracht hat und durch seine herzliche Art dem Laboralltag stets eine angenehme Atmosphäre verliehen hat.
- Andrea Wissmann, der guten Seele des Labors, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und für jegliches Problem eine Lösung parat hatte.
- Uzoho Chinaka und Jonas Meyer, von denen ich einige Dinge lernen konnte und die mit ihrer freundlichen und hilfsbereiten Art ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben und Jonas insbesondere für das Korrekturlesen.
- Meinen Eltern für die unermüdliche Unterstützung im Entstehungsprozess dieser Arbeit, für die Liebe und das Vertrauen, dass sie mir stets entgegen bringen und mich immer wieder dazu ermutigen, in allen Lebenslagen neugierig, interessiert und begeistert zu sein, Hürden zu bezwingen und stets mein Bestes zu geben.
- Meiner Schwester für die ebenfalls tolle Unterstützung, für die fachliche Kompetenz beim Korrekturlesen und einfach dafür, dass es dich gibt.
- Dr. Rudolf Reisinger für die tollen Tipps und Tricks bei der Entstehung dieses Werkes.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.