Aus der Abteilung Innere Medizin I (Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. G. Adler),
Sektion Endokrinologie (Sektionsleiter Prof. Dr. B.O. Böhm)
der Universität Ulm

Funktionelle Charakterisierung humaner T-Zellen beim Typ 1 Diabetes

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Dipl. biol. Silke M. Rosinger

geboren in Ulm an der Donau

2003

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. R. Marre
Erstgutachter:	Prof. Dr. B.O. Böhm
Zweitgutachter:	Prof. Dr. H.-J- Fehling
Tag der Promotion:	18. Juli 2003

Meinen Eltern Karin und Wilhelm in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Abkürzungsverzeichnis vi

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 11

2.1 Probanden und Materialaufbereitung 11

2.1.1 Untersuchungsgruppe KP: gesunde Kontrollpersonen 11

2.1.2 Untersuchungsgruppe T1D: Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus 13

2.1.3 Untersuchungsgruppe T2D: Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus 13

2.1.4 Untersuchungsgruppe Ak+: Probanden ohne manifestierten T1D aber positiven Antikörper-Titer 14

2.1.5 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC= Peripheral Blood Mononuclear Cells) 14

2.1.6 Bestimmung der Zellzahl 15

2.1.7 Bestimmung der Autoantikörper-Titer 16

2.1.8 Bestimmung der HLA (Human Leucocyte Antigen)-Allele 17

2.1.9 Antigene 17

2.2 Zellkultur 20

2.2.1 Austesten des Humanserums 20

2.2.2 Selektion verschiedener PBMC-Subpopulationen 21

2.2.3 Kurzzeitstimulation 22

2.2.4 Methoden der T-Zell-Kultivierung 22

2.2.5 Antigenpräsentierende Zellen (APC) 24

2.2.6 Präparation der T-Zellen 24

2.2.7 Limiting Dilution 24

2.3 Charakterisierung von Zellsubpopulationen und T-Zell-Linien 25

2.3.1 Proliferations-Assay 25

2.3.2 Zytokinbestimmungen 26

2.3.3 Nachweis der Spezifität von T-Zell-Linien 28

2.3.4 MHC-Restriktionsanalyse von T-Zell-Linien 29
2.3.5 Peptidbindungsmotiv von T-Zell-Linien 31
2.3.6 T-Zell-Rezeptor (TZR)-Analyse 31
2.3.7 Selektion von Vβ-positiven Zellen 43
2.3.6 Phänotypisierung der T-Zell-Linien 44
2.3.8 Phänotypisierung der T-Zell-Linien mittels Durchflusszytometrie 44
2.4 Populationsstudie 45
2.4.1 Einfluss von co-stimulatorischen Molekülen 45
2.4.2 Durchflusszytometrie 46
2.5. Statistik 47
3 Ergebnisse 48
3.1 T-Zell-Linien 48
3.1.1 Patientendaten 48
3.1.2 Zytokinmuster verschiedener Zell-Populationen 49
3.1.3 Etablierung spezifischer T-Zell-Linien 51
3.1.4 Nachweis der Spezifität 52
3.1.5 Natürlich prozessierte Epitope 56
3.1.6 Nachweis der Peptidpräsentation 57
3.1.7 Restriktionsanalyse 59
3.1.8 Epitop Mapping 63
3.1.9 T-Zell-Rezeptor (TZR)-Analyse 68
3.1.9 Phänotypisierung der Linien 74
3.2 Populationsstudie 78
3.2.1 Deskriptive Statistik der Studienpopulationen 78
3.2.2 Identifizierung geeigneter Oberflächen-Aktivierungsmarker 80
3.2.3 Optimierung des Nachweises antigenspezifischer T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation 81
3.2.4 Einfluss der Co-Stimulation durch Zugabe des monoklonalen anti-CD28 Antikörpers auf die Detektion antigenspezifischer T-Zellen 82
3.2.5 Phänotypisierung der antigenspezifischen Zellen 84
3.2.6 Gesamtergebnisse Kontrollen und Patienten 86

3.2.7 Qualitätskontrollen der Populationsstudie 91
3.2.8 Beschreibung der Autoantikörper positiven Probanden 95
3.2.9 Beschreibung der T2D-Patienten 97

4 Diskussion 98

4.1 T-Zell-Linien 99
4.1.1 Zusammenfassung 99
4.1.2 Zytokinmuster verschiedener Zell-Populationen 101
4.1.3 Etablierung spezifischer T-Zell-Linien 102
4.1.4 Spezifität der T-Zell-Linien 103
4.1.5 Natürlich prozessierte Epitope 104
4.1.6 Restriktionsanalyse 105
4.1.7 Epitop Mapping 106
4.1.8 T-Zell-Rezeptor (TZR)-Analyse 108
4.1.9 Phänotypisierung der Linien 110
4.2 Populationsstudie 111
4.2.1 Zusammenfassung 111
4.2.2 Studienpopulationen 111
4.2.3 Geeignete Oberflächen-Aktivierungsmarker 112
4.2.4 Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation 113
4.2.5 Einfluss der Co-Stimulation auf die Detektion antigenspezifischer T-Zellen 114
4.2.6 Gesamtergebnisse der Kontrollpersonen im Vergleich zu T1D-Patienten 115
4.2.7 Beschreibung der T2D -Patienten 119
4.2.8 Ox40-Expression als Screening-Parameter 119
4.3 Schlussfolgerung 120

5 Zusammenfassung 121

6 Literaturverzeichnis 123

7 Verzeichnis der Abbildungen 142

8 Verzeichnis der Tabellen 146

9 Anhang 149

10 Danksagung 159

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AAk	Autoantikörper
Ag	Antigen
Ala	Alanin
Ak+	Antikörper positive Probanden
APC	Antigenpräsentierende Zellen
-APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
C	konstantes Gensegment
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CDR	complementary determinig region (Komplementarität bestimmende Region)
µCi	micro Curie
CO_2	Kohlendioxid
CP	Kontrollpeptid
C-Peptid	Connecting-Peptid
cpm	counts per minute
D	Diversitätsgensegment
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DPT-1	Diabetes Prevention Trial-Type 1

EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immuno Spot
EM	Erstmanifestiert
ENDIT	European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial
FACS	Flourescence Activating Cell Sorter
FAM	blauer Fluoreszenz-Farbstoff des Primers der C-Region
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	frisch manifestiert
FSC	Forward-Scatter
GAD65	65kD Glutamatdecarboxylase
GADA	Autoantikörper gegen Glutamatdecarboxylase
Gy	Gray
h	Stunde
3H	Tritium markierter Wasserstoff
HS	Human Serum
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
I	Insulin
IA-2	Tyrosinphosphatase
IA-2A	Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase
IAA	Autoantikörper gegen Insulin
ICA	islet cell Antibody (Antikörper gegen Inselzellgewebe)
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio-(-D)-galactosid
IQR	Interquartilrange

J	Joining (bindendes) Gensegment
JDFU	Juvenile Diabetes Foundation Units
kD	Kilodalton
KP	Kontrollperson
KU	Karlsburg Units
L	Liter
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
LR	Lower Right
M	Molar
MACS	magnetic cell sorting
MAK	monoklonale Antikörper
Max	Maximum
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minuten
Min	Minimum
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MuLV	Murine Leukemia Virus
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NK	natürliche Killerzellen
nm	nanometer
NOD	Nonobese diabetic
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBMC	Periphere Blood Mononuclear Cells (Blutlymphozyten des peripheren Blutes)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorphyll protein
PFA	Paraformaldehyd
pg	picogramm
pH	potentia hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PI	ProInsulin
PPI	PräProInsulin
R	Region
RhIL-2	Rekombinantes humanes IL-2
RNA	Ribonucleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transkriptase PCR
sec	Sekunde
SI	Stimulationsindex
SOC	Standardrmedium zur Transformation
SS	Signalsequenz
SSC	Sideward-Scatter
StdAbw.	Standardabweichung
T1D	Typ 1 Diabetes
T1D-EM	Erstmanifestierter Typ 1 Diabetes Patient
T2D	Typ 2 Diabetes
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCGF	T Cell Growth Factor
TEMED	N,N,N′,N′-Tetramethyl-ethylendiamin

TET	grüner Fluoreszenz-Farbstoff des Primers der C-Region
Th	T-Helfer
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TT	Tetanus Toxoid
TZR	T-Zell Rezeptor
TZRAV	variable α-Familie des TZR
TZRBV	variable β-Familie des TZR
TZRAC	konstante α-Familie des TZR
TZRBC	konstante β-Familie des TZR
U	Units
UV	ultraviolett
V	variables Gensegment
W	Well
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-b-D-Galactopyranosid, Laktoseanalogon

Aminosäuren und Nukleotide* wurden nach dem internationalen Ein-Buchstaben-Code abgekürzt:

G	Glycin	T	Threonin
A	Alanin	N	Asparagin
V	Valin	Q	Glutamin
L	Leucin	D	Asparaginsäure
I	Isoleucin	E	Glutaminsäre
C	Cystein	K	Lysin
M	Methionin	R	Arginin
F	Phenylalanin	P	Prolin
Y	Tyrosin	T*	Thymidin
W	Tryptophan	C*	Cytidin
H	Histidin	A*	Adenosin
S	Serin	G*	Guanosin

1 Einleitung

Der Diabetes mellitus ist eine der häufigsten chronischen Stoffwechselerkrankungen mit ständig ansteigender Inzidenz. Heutzutage ist bereits eins von 300 Kindern betroffen. Bei Erwachsenen geht man sogar von einer noch höheren Inzidenz aus [188].

Der Diabetes mellitus ist gekennzeichnet durch einen relativen oder absoluten Mangel an sezerniertem Insulin. Definitionsgemäß zeigt sich als Hauptsymptom der erhöhte Blutglukosespiegel. Als Folgeerscheinungen des ständig erhöhten Blutglukosespiegels finden sich Ketoazidose, Sehstörungen, Polyurie, Gewichtsverlust oder vermehrte Infektanfälligkeit. Diese können durch eine exogene Insulin-Applikation weitestgehend behoben werden. Wird die mangelhafte Regulation der Glukoseaufnahme der Zelle nicht behoben, so zeigen sich bei persistierenden hyperglykämischen Stoffwechselzuständen Veränderungen besonders an den Blutgefäßen, die in der Folge zur diabetischen Nephropathie, Polyneuropathie oder zur diabetischen Retinopathie führen können. So ist eine der häufigsten Erblindungsursachen in den zivilisierten Ländern die diabetesbedingte Netzhautveränderung. Diese schwerwiegende Folgen führen zu einem nicht unerheblichen volkswirtschaftlichen Schaden. Aufgrund der Kosten der Erkrankung, der ständig steigende Inzidenz in der westlichen Welt und dem bis heute noch unheilbaren Verlauf der Erkrankung als solche [104], gewinnt die Aufklärung der Ursachen eine besondere Bedeutung.

Diabetes mellitus läßt sich in zwei Subtypen unterteilen, den Typ 1 und Typ 2 Diabetes.
Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) beruht auf einem relativen Insulinmangel durch Sekretionsstarre verbunden mit peripherer Insulinresistenz. Dies bedeutet, dass entweder die Insulinsekretion vermindert oder die Insulinwirkung an der Zelle herabgesetzt ist. In der Pathogenese spielen hier vor allem Adipositas und der Bewegungsmangel eine wesentliche Rolle. So erkranken vorwiegend Erwachsene an dieser Form des Diabetes mellitus. In der bisher verwendeten Nomenklatur sprach man daher auch vom sogenannten „Altersdiabetes". Aufgrund der zunehmenden Zahl an Adoleszenten, die bedingt durch die o.g. Faktoren und begünstigt durch veränderte Ess- und Lebensgewohnheiten (Fast-Food, ungenügende Bewegung) schon früh an einem relativen Insulinmangel leiden, wurde die Klassifikation angepasst. Man bezeichnet diese Form im Rahmen einer ätiopathogenetisch orientierten Einteilung als Typ 2 Diabetes mellitus.

Im Gegensatz zu Typ 2 Diabetes handelt es sich bei Typ 1 Diabetes mellitus (T1D) um eine organspezifische Autoimmunerkrankung mit absolutem Insulinmangel. Die Pathogenese ist gekennzeichnet durch eine Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in das Pankreas [87, 142]. Im Rahmen dieser Infiltration kommt es zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Langerhans´schen β-Zellen [27]. Die Manifestation erfolgt über einen längeren Zeitraum. Aus Untersuchungen an NOD (Nonobese diabetic) Mäusen konnte dabei eine Unterteilung der Diabetes-Entwicklung in drei Perioden dargelegt werden.
(i) In der Initiationsphase schafft das Zusammenwirken von genetischen Risikofaktoren und bestimmten Umweltbedingungen die Voraussetzungen für die Diabetesentwicklung. Dabei kommt es zu einer Infiltration von T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen und Neutrophilen in die Randzone der Langerhans´schen Inseln. Diese Phase wird auch als Periinsulitis bezeichnet [93].
(ii) Die zweite Phase wird als prädiabetische Phase bezeichnet und ist durch eine vollständige Invasion der Inseln durch pathogene T-Zellen und Makrophagen gekennzeichnet. Da T1D-Patienten in dieser Periode noch symptomfrei sind, existieren dazu nur wenige Daten aus der Forschung. In Familienstudien und im Rahmen einer groß angelegten Schulkinderstudie konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrzahl der T1D-Patienten Autoantikörper gegen verschiedene Inselzellantigene, wie z.B. Insulin, produzieren [25]. Aus diesen Studien und auch aus der kürzlich durchgeführten *Karlsburger Studie* [166] ging hervor, dass Autoantikörper bereits Monate bis Jahre vor der Manifestation im Serum nachweisbar sind.
(iii) Das Auftreten der diabetischen Symptome in der dritten Periode, der diabetischen Phase, kommt durch den Verlust von mindestens 90% der β-Zellmasse im Pankreas

zustande [167]. Bei der Manifestation des T1D ist die autoimmune Reaktion gegen eigenes Pankreasgewebe fast schon beendet. Derzeit bestehen in diesem Stadium keine Heilungsmöglichkeiten. Lediglich durch eine frühe Erkennung des fortschreitenden Immunprozesses und Erhalt oder Ersatz von funktionell intakten β-Zellen könnte eine wirkungsvolle Therapie ermöglicht werden.
Bei Typ 1 Diabetes handelt es sich somit um eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die auf dem Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren beruht. Dabei lassen sich sowohl humorale (wie z.B. Inselzell-Antikörper), als auch zelluläre Immunphänomene (z.B. Aktivierung von Lymphozyten und mononukleären Zellen im peripheren Blut) nachweisen.

Genetische Prädisposition

Bei Typ 1 Diabetes aber auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B Myasthenia Gravis, Rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose [110, 179], spielt die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle [43]. Etwa 10% der an T1D erkrankten Personen weisen eine positive Familienanamnese auf [33, 77]. *Wucherpfennig* hat dabei ein 50%-iges T1D-Risiko bei eineiigen Zwillingen, deren Eltern an T1D erkrankt sind, beschrieben [188].
Zusammen mit dem von *Morahan* [112] bzw. *Adorini* [4] beschriebenem Locus sind heute insgesamt 18 Loci (IDDM 1-18) auf dem menschlichen Genom bekannt, die mit der Entwicklung von T1D assoziiert zu sein scheinen. Einer der Haupt-Loci ist das Insulin-Gen (IDDM2) [17, 46, 172] auf Chromosom 11p15.5 des menschlichen Genoms. IDDM2 beinhaltet eine variable Menge an sogenannten „Tandem Repeats" (VNTR) [103]. Dabei begünstigt eine geringe Anzahl an VNTR-Repeats (26-63 Repeats) die T1D Entwicklung, während viele Repeats (>140) protektiv wirken [18, 19]. Die wohl am besten charakterisierten genetischen Marker für eine T1D-Prädisposition sind die Gene des sogennanten „Major-Histocompatibility-Complex" (MHC) auf Chromosom 6p21 des menschlichen Genoms (IDDM1) [17, 35, 46, 172]. Die Gene des MHC, für dessen Erstbeschreibung *George Snell*, *Jean Dausse*t und *Baruj Benacerraf* 1980 den Nobelpreis erhielten, sind an der Unterscheidung von „Selbst" (*host*) und „Fremd" (*graft*) beteiligt [109] und weisen einen sehr starken Polymorphismus auf. Der MHC umfasst drei verschiedene Klassen. Die Klasse-I Region besteht aus den „Human-Leucocyte-Antigen" (HLA) Genen A, B und C, die auf allen kernhaltigen Körperzellen zu finden sind [157]. In der Klasse-III Region sind unter anderem die Komplementfaktoren zusammengefasst. Es sind aber vor allem die HLA-Klasse-II Gene (HLA-DR, -DQ, -DP), die früher auch als „Immunresponsegene" beschrieben wurden, die eine wichtige Rolle bei der T1D-Entwicklung spielen. Während Multiple Sklerose vor allem in Verbindung mit

HLA-DR2 steht [95], ist die T1D-Suszeptibilität mit HLA-DR3, -DR4 bzw. HLA-DQ8, -DQ2 assoziiert [168, 170]. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass HLA-DQ8 (DQB1*0302, DQA1*0301) und HLA-DQ2 (DQB1*0201, DQA1*0501), die mit HLA-DR4 bzw. -DR3 gekoppelt vererbt werden, das höchste T1D-Risiko aufweisen [92, 158]. Das HLA-DQ8 Allel wurde als determinierender Faktor für eine T1D-Prädisposition oder -Resistenz beschrieben [14, 173].
Aufgrund der ähnlichen Kristallstrukturen der menschlichen HLA-DQ8 und der entsprechenden Maus MHC-I-Ag7 Allele wird vermutet, dass Diabetes bei Menschen und NOD-Mäusen mit einer vergleichbaren Antigen-Präsentation zusammenhängt [99]. In beiden Allelen zeigt sich ein Fehlen der Asparaginsäure an Position 57 der B-Kette. Dies führt zu einer positiven Ladung der für die Peptidbindung wichtigen Tasche P9 [99]. Eine Nicht-Asparaginsäure an Position 57 des DQ8-Alleles wird demzufolge mit einem gesteigerten T1D-Risiko assoziiert; so konnte z.B. eine Diabetesentwicklung bei DQ6 transgenen Mäusen nicht beobachtet werden. HLA-DQ6, welches eine Asparaginsäure an Position 57 trägt, wirkt daher protektiv [187]. Das gesteigerte T1D-Risiko, das durch die Präsenz von HLA-DQ8 entsteht, kann durch HLA-DR4 Allele, die meist gekoppelt mit DQ8 vererbt werden, modifiziert werden. Die HLA-DRB1*0401, *0402 bzw. *0405 Allele verstärken die T1D-Anfälligkeit. Die HLA-DRB1*0404, 0403 und 0406 Allele zeigen dagegen einen steigenden Grad an Protektion [174]. Im transgenen Maus-Modell zeigte sich allerdings eine reduzierte Diabetes-Inzidenz bei der Co-Expression von HLA-DRB1*0401 und HLA-DQ8 im Gegensatz zu einer alleinigen DQ8-Expression [186]. Es bleibt also noch weitgehend ungeklärt, ob DR- oder DQ-Allele die Hauptrolle bei der genetischen Prädisposition spielen. Der Haplotyp HLA-DR3/4 zusammen mit DQ2/8 weist jedoch unangefochten das höchste T1D-Risiko auf [40, 121]. Dies konnte auch in einem transgenen Maus-Modell nachgewiesen werden [3].

Umwelteinflüsse

Neben der genetischen Prädisposition kommen bei der Entwicklung des T1D auch exogene Faktoren zum Tragen. Zum Beispiel zeigten *Olmos* bzw. *Atkinson* in ihren Untersuchungen, dass nur bei 30% von eineiigen Zwillingen beide Geschwister an T1D erkranken [9, 124]. Weitere Untersuchungen an eineiigen Zwillingen ergaben eine Konkordanz von nur 5%, wenn der erste Zwilling erst im Alter von über 25 Jahren einen T1D entwickelte [188]. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen lassen auf einen nicht unerheblichen Einfluss von Umweltfaktoren bei der T1D-Entstehung schließen. So konnte auch *Bach* eine Korrelation zwischen der geographischen Breite bzw. dem Verbrauch von Kuhmilch und dem Diabetes-Risiko einer Bevölkerung feststellen [11].

Eine der sehr häufig diskutierten Thesen ist der Einfluß von Virus-Infektionen auf die T1D Entwicklung. Zum einen konnte aus epidemiologischen Studien nachgewiesen werden, dass die Diabetes-Inzidenz nach Virus-Epidemien anstieg [180], zum anderen fand sich bei neumanifestierten T1D-Patienten ein erhöhter Antikörper-Titer gegen Viren im Serum [24, 169]. *Yin* konnte in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) von frisch manifestierten Patienten ein Vorkommen von Enterovirus RNA im Vergleich zu PBMC einer Kontrollgruppe nachweisen [189]. Ein wichtiger Punkt in diesem Zusammenhang ist das sogennante „Molecular Mimicry". Dieser Begriff wurde ursprünglich von *George Snell* eingeführt und erklärt dieses Phänomen auf der Ebene struktureller Antigen-Ähnlichkeiten zwischen infektiösen Agens und der Wirtszelle [161]. Bedingt durch strukturelle Ähnlichkeiten kommt es zur Produktion von Autoantikörpern, die eine Aufhebung der Toleranz bedingen können und so einen Zustand der Autoimmunität induzieren. Als „Molecular Mimicry" wird z.B. auch das Vorhandensein von Sequenzhomologien zwischen Viren und T1D-assoziierten Autoantigenen bezeichnet. So sind zwischen dem Autoantigen Glutamatdekarboxylase (GAD65) und dem Coxsackie-Virus Sequenzhomologien zu finden [9, 89]. Auch auf dem Tyrosinphosphatase (IA-2)-Molekül finden sich Sequenzhomologien mit dem Virus-Protein 7 des Rotavirus [74, 75]. Die funktionellen Zusammenhänge sind jedoch noch nicht genau geklärt.

Humorale Immunphänomene

Als klassische Marker für eine beginnende Autoimmunreaktion gelten nachweisbare Autoantikörper, die über Jahre vor klinischer Manifestation eine Autoimmunerkrankung anzeigen [21, 176]. Obwohl die nachweisbaren humoralen Autoantikörper nicht direkt an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind, kann man beim Typ 1 Diabetes durch den Nachweis dieser Immunphänomene das Erkrankungsrisiko vorhersagen. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen Inselzellgewebe (ICA) ist assoziiert mit einem deutlich erhöhten T1D Risiko bei T1D-Verwandten ersten Grades [26, 141] und auch bei nach ICA-gescreenten Schulkindern [66, 150]. Das höchste Risiko an T1D zu erkranken haben Personen mit multiplen Autoantikörpern gegen β–Zell-Autoantigene [94, 176], wie zum Beispiel der Co-Sekretion von GAD65-, IA-2- und/oder Insulin (IAA)-Antikörpern [22, 177]. Innerhalb der Diabetespräventionsstudie DPT-1 (Diabetes Prevention Trial-Type 1) wurden erstgradige Verwandte von Typ-1-Diabetikern serologisch untersucht. Dabei wurden nur ICA positive Verwandte, die zusätzlich noch positive GAD65- und/oder ICA512- Antikörpertiter aufwiesen, d.h. ein sehr hohes T1D-Risiko haben, in die eigentliche Studie aufgenommen [190]. In dieser Studie konnte die Validität eines autoantikörperbasierten Vorhersagemodells an mehr als 500 000 untersuchten Personen zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Ein positiver Antikörpertiter bzw. die Funktion der B-Zellen ist jedoch nicht zwingend an der T1D-Entwicklung beteiligt. *Martin et al.* konnte dies anhand eines Patienten mit X-chromosomaler Agammaglobulinämie, einer Immundefizienz, bei der die B-Zell Differenzierung unterbrochen wird, nachweisen [106].

Zelluläre Immunphänomene:
Bei allen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. bei Multipler Sklerose [134], Rheumatoider Arthritis [76], Myasthenia Gravis [107] und bei Typ 1 Diabetes [11] handelt es sich ohne jeden Zweifel um T-Zell vermittelte Erkrankungen, bei der die T-Zellen gegen bestimmte Autoantigene reagieren. Bei T1D ist die T-Zell-Reaktion gegen verschiedene β-Zell-Autoantigene gerichtet. Als Autoantigen wird ein körpereigenes Antigen bezeichnet, welches von sogenannten autoreaktiven T-Lymphozyten als pathogen erkannt wird. Von den in Tab. 1 dargestellten beschriebenen Autoantigenen sind Glutamatdecarboxylase 65 [10, 152], Tyrosinphosphatase [51, 128] und Insulin (I) [125, 140] mit seinen Prohormonen ProInsulin (PI) [41, 156] und PräProInsulin (PPI) [41] am besten untersucht.

Tabelle 1: Chronologische Reihenfolge der bei Typ 1 Diabetes entdeckten Autoantigene.

Autoantigen	***Jahr***	***Autor***
Cytoplasmatische Insellzell-Antikörper (ICA)	1974	*Bottazzo* [27]
64 kD Inselzell-Protein	1982	*Baekkeskov* [13]
Insulin	1983	*Palmer* [125]
37/40kD-Proteinfragmente eines 64kD MembranPorteins	1990	*Christie* [38]
Heat-shock Protein p69	1990	*Jones* [82]
Glutamatdecarboxylase	1990	*Baekkeskov* [12]
Carboxypeptidase H	1991	*Castano* [34]
38kD Inselzell-Protein	1991	*Roep* [143]
Sulfatide	1993	*Buschard* [30]
Glukosetransporter	1993	*Inman* [80]
69 kD Inselzell-Protein (ICA69)	1993	*Pietropaolo* [132]
Thyrosinphosphatase ICA512	1994	*Rabin* [136]
Thyrosinphosphatase IA-2	1994	*Lan* [96]
BSDL (bile salt-dependent lipase)	1999	*Panicot* [126]
ICA12/SOX13	2000	*Kasimiotis* [86]
HIP/PAP	2002	*Gurr* [67]

Das 1990 identifizierte Enzym Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65) [12] wird in den Langerhans´schen β-Zellen aber vor allem in bestimmten Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert, wo es die Synthese des inhibitorischen Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure aus Glutamat katalysiert [12]. Die Synthese von GAD65 wird durch hohe Blutglukosekonzentrationen in den pankreatischen β-Zellen stimuliert [23].

Die von *Lan* 1994 entdeckte Tyrosinphosphatase (IA-2) [96] wird ebenfalls in den Langerhans´schen β-Zellen und in vielen Teilen des zentralen Nervensystems exprimiert. Die Funktion von IA-2 ist aber noch weitgehend ungeklärt, da IA-2 keine enzymatische Fähigkeit besitzt [101].

Unter den potentiellen Autoantigenen bei T1D ist Insulin und seine Prohormone Pro-Insulin (PI) bzw. PräProInsulin (PPI) das einzige, das ausschließlich auf den β-Zellen der Langerhans´schen Inseln exprimiert wird [156] und deswegen eine Sonderstellung einnimmt. Die biologisch aktive Form des Insulins entsteht durch endoproteolytische Spaltung des Proinsulins [90] und besteht aus jeweils einer über Disulfidbrücken verbundenen A- und B-Kette. Das PräProInsulin-Molekül besitzt neben der Signalsequenz am N-terminalen Ende der B-Kette noch das verbindende („connecting") C-Peptid. Das C-Peptid dient im PI-Molekül als Verbindung zwischen A- und B-Kette. Durch die natürliche Prozessierung des Proinsulins sind auf der Oberfläche der β-Zellen nur noch kleine Teile (Epitope) des ursprünglichen Moleküls zu finden. Das Interesse liegt heute darin, die Epitope zu definieren, die eine Autoimmunreaktion auslösen. Während *Schloot et al.* keine immunodominanten Epitope nachweisen konnte [153], sind zumindest in diversen Maus-Modellen [2, 20, 41, 44, 139, 182] und auch im humanen System [5, 63, 119, 154, 156] bis heute sehr viele verschiedene Epitope des PPI-Moleküls beschrieben, die möglicherweise immunodominant zu sein scheinen. Sowohl im NOD-Maus Modell als auch im humanen System konnte das Insulin B-Ketten Peptid B9-23 als immunodominant identifiziert werden [5, 182]. Bei der NOD-Maus konnte z.B. durch subkutane Verabreichung dieses Peptides eine Hemmung der Diabetes-Entwicklung erzielt werden [2]. Das Peptid des Proinsulin C-Peptides C18-A1 weist eine sehr hohe Bindungsaffinität an HLA-DRB1*0401 auf [63]. Auch dieses Epitop wurde sowohl im transgenen Maus-Modell [41] als auch im humanen System als immunodominant beschrieben [54].

Die autoreaktiven T-Zellen, die gegen Autoantigene reagieren, lassen sich interessanterweise nicht nur bei T1D-Patienten nachweisen, sondern auch im peripheren Blut von gesunden Personen [7, 129]. Die autoreaktiven T-Zellen dieser gesunden Kontrollpersonen besitzen allerdings eine geringere Antigenaffinität [102]. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die im Thymus stattfindende Selektion der T-Zellen dabei eine wichtige Rolle spielt. Zum Beispiel wirkt sich der HLA-Haplotyp DR2/DQ6 stark

protektiv gegen eine T1D-Entwicklung aus. Das Insulin-Gen (IDDM2) ist im Thymus exprimiert [175]. Große Mengen an Insulin mRNA gehen mit dem protektiven HLA-Haplotyp einher. Dies könnte zu einer negativen Selektion von insulinspezifischen T-Zellen führen. T-Zellen, die eine hohe Antigenaffinität aufweisen, werden durch die negative Selektion aus dem Thymus eliminiert.

Obwohl die Ätiologie von Autoimmunerkrankungen noch weitgehend unbekannt ist, wird den autoreaktiven T-Zellen eine Vermittlerrolle zugesprochen [62]. Allerdings gibt es zahlreiche Anhaltspunkte dafür, dass T-Zellen auch regulatorische Funktionen übernehmen können [160]. Eine Hypothese für die Entstehung regulierender autoreaktiver T-Zellen ist, dass bestimmte Subtypen von antigenpräsentierenden Zellen (APC) eine wichtige Rolle bei der Induktion und Modifizierung regulatorischer T-Zellen spielen [83]. Als professionelle APC gelten dabei vor allem die dendritischen Zellen (DC). Unreife DC exprimieren geringe Mengen an MHC-Klasse-II und co-stimulatorischen Molekülen. Bei der Reifung der dendritischen Zellen werden diese Moleküle als Antwort auf einen Stimulus stark hochreguliert [15, 16]. Damit ist der Grundstein für die Aktivierung von Effektor T-Zellen gelegt. Unreife DC, die wenig HLA-Moleküle tragen, könnten somit als Wächter der Induktion und des Erhaltens der peripheren Toleranz dienen [60, 163].

Diese Hypothese stimmt mit den Diskussionen über verschiedene Subklassen von regulatorischen T-Zellen überein. Die Entwicklung der regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus naiven T-Zellen kann *in vitro* durch repetitive Stimulation mit allogenen unreifen DC und Abwesenheit von immunmodulatorischen Agenzien induziert werden [84]. Bei den $CD4^+CD25^+$ T-Zellen handelt es sich um naive, offenbar nicht expandierende T-Zellen, die große Mengen an Interleukin (IL)-10 aber kein IL-4, IL-5 oder IL-2 sezernieren. Sie proliferieren schwach und reagieren völlig antigenunabhängig. Diese IL-10 produzierenden T-Zellen können direkt die antigenspezifische Proliferation von T-Helfer (Th)1-Zellen hemmen; ihre suppressive Wirkung kann allerdings durch eine IL-2 Zugabe aufgehoben werden [83].

Eine optimale Aktivierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen erfordert zwei Signale, die von antigenpräsentierenden Zellen übermittelt werden: Erstens, die Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor (TZR) und zweitens, die Interaktion von co-stimulatorischen Molekülen und deren Liganden. Neben den CD28/B7 Interaktionen wird derzeit die Funktion einer TNF/TNFR Interaktion diskutiert. Ox40 (CD134) ist ein Mitglied der TNFR Familie und spielt bei der Induktion der T-Zell-Antwort ein große Rolle [97]. Die Ligation von Ox40 auf T-Zellen stimuliert *in vitro* sowohl die Proliferation als auch die Zytokinsekretion [123, 144]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass ein Engagement von Ox40 das Überleben und die Expansion von naiven $CD4^+$ T-Zellen und das Überleben von Memory T-Zellen durch Hemmung der

peripheren Deletion steigert [65, 108]. Dendritische Zellen scheinen dabei als einzige die Kapazität zu besitzten, naive T-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu aktivieren, da sie im reifen Zustand eine sehr große Zahl an MHC bzw. an co-stimulatorischen Molekülen exprimieren [79, 98]. *De Smedt* konnte zeigen, dass die Co-Stimulation über Ox40 die T-Zell-Antwort, die durch dendritische Zellen induziert wurde, *in vivo* steigert [47].
Wie bereits ausgeführt, spielen T-Lymphozyten bei der T1D-Entwicklung die wichtigste Rolle [45]. Jedoch ist die relative Verteilung, die Bedeutung und die Funktion der $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen immer noch unklar [28, 111]. Beim Typ 1 Diabetes wird vor allem den $CD4^+$ Th-Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugesprochen [125, 137]. Die β-Zell Zerstörung an sich wird meistens mit dem Aktivierungsgrad und dem Phänotyp von autoreaktiven Th1-Zellen assoziiert [42, 122]. Th1-Zellen sind in der destruktiven Phase der Intra-Insulitis nachweisbar und werden durch die Sekretion von Interferon-γ (IFNγ) [138], Tumornekrosefaktor-α (TNFα) oder Interleukin-2 (IL-2) definiert [32, 147]. Im Gegensatz dazu gibt es Th2-Zellen, die im Kontext organspezifischer Autoimmunität eine regulatorische Rolle übernehmen und durch Produktion von IL-4, IL-5 oder IL-10 charakterisiert sind [117, 137]. Diesen Th2-Zellen bzw. deren sezernierten Zytokine konnte im Mausmodell des Diabetes eine eher protektive Wirkung zugesprochen werden [31, 137].

Derzeit gibt es viele Präventionsstudien, die versuchen, schon früh in den Immunprozess einzugreifen. In der ENDIT-Studie (European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial) wird eine Behandlung von Risiko-Probanden mit *Nicotinamid* untersucht [151]. Die DPT1 Studie (Diabetes Prevention Trial-Type 1) untersuchte eine möglicherweise prophylaktische Auswirkung einer oralen oder parenteralen Administration von Insulin auf die T1D-Entwicklung bei Probanden mit erhöhtem T1D-Risiko [190]. Dabei konnte jedoch nach neuesten Erkenntnissen bei Personen mit erhöhtem Risiko an T1D zu erkranken, keine Verzögerung bzw. Verhinderung von T1D erzielt werden. Gegenüber dem Erwartungswert kam es vereinzelt sogar zu einer schnellere Manifestation [1]. Jedoch kann man aus diesen negativen klinischen Erfahrungen durchaus auch positive Schlüsse für zukünftige Studien ziehen [133]. So ist ohne jeden Zweifel für die erfolgreiche Entwicklung neuer Therapieansätze ein verbessertes Verständnis über die Pathogenese von T1D zwingend notwendig. Das Ziel der eigenen Untersuchungen war es, das Mosaik der Pathogenese des Typ 1 Diabetes durch weitere Erkenntnisse zur zellulären Immunität zu ergänzen.

Wie bereits erwähnt, gibt es in der Literatur kontroverse Berichte hinsichtlich der Existenz von immunodominanten Epitopen des Autoantigens Insulin mit seinen Prohormonen Proinsulin und PräProInsulin. Dabei zeigen sich vor allem in der jeweiligen

Methodik sehr große Unterschiede. Aufgrund der starken Bindungsaffinität an das T1D assoziierte HLA-Molekül DRB1*0401, ist das Proinsulinpeptid C18-A1 ein potentielles Epitop, das immunodominant sein könnte. Im transgenen Mausmodell und auch im Kurzzeitversuch im humanen System konnte dies schon nachgewiesen werden. Im humanen System ist jedoch nur wenig bekannt über die genaue Charakterisierung dieses Epitopes.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Involvierung der Interaktion von Ox40 und Ox40-Ligand an der Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen durch professionelle APC maßgeblich beteiligt zu sein scheint. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass autoreaktive T-Zellen nicht nur in T1D-Patienten, sondern auch in gesunden Normalpersonen zu finden sind. Unklar ist bisher noch in welcher Frequenz autoreaktive T-Zellen in der Peripherie vorkommen. Des weiteren ist unklar, ob sich die autoreaktiven T-Zellen von T1D-Patienten und Normalpersonen phänotypisch voneinander unterscheiden.

In der vorliegenden Studie sollen deshalb insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Lassen sich epitopspezifische Zellen aus peripheren Blutlymphozyten mit Hilfe von PräProInsulin (PPI)-Peptiden, die in der Literatur als immunodominant beschrieben wurden, identifizieren und kultivieren?
2. Können mit Hilfe von FACS-basierten bzw. immunologischen Analysen spezielle Charakteristika dieser spezifischen Zellen festgestellt werden?
3. Wenn solche epitopspezifischen Zellen identifiziert werden können, lassen sich eventuelle phänotypische Unterschiede dieser T-Zellen zwischen T1D-Patienten und gesunden Normalpersonen nachweisen?
4. Gibt es dabei auch Unterschiede in der Frequenz der autoreaktiven T-Zellen zwischen T1D-Patienten und Normalpersonen?
5. Wenn es phänotypische Unterschiede zwischen autoreaktiven T-Zellen von T1D-Patienten und gesunden Kontrollpersonen gibt, können dadurch in einem Kurzzeitversuch bei T1D-Patienten immundominante Epitope des PräProInsulins bestimmt werden?

2 Material und Methoden

2.1 Probanden und Materialaufbereitung

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 12 „gesunde“ Kontrollpersonen (Kollektiv „KP“), 24 Patienten mit autoimmunem Typ 1 Diabetes mellitus (Kollektiv „T1D“), vier Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (Kollektiv „T2D“) und drei Probanden mit positivem Autoantikörper Titer, sogenannte Prä Typ 1 Diabetes Probanden (Kollektiv „Ak+“) untersucht. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt.

2.1.1 Untersuchungsgruppe KP: gesunde Kontrollpersonen

Insgesamt wurden 12 Probanden des Studienkollektives „Gesund (KP)“ in die Studie aufgenommen. Einschlusskriterien der Untersuchungsgruppe „KP“ waren im Normalbereich liegende Autoantikörper Titer gegen Inselzellgewebe (ICA), Insulin (IAA), Tyrosinphosphatase (IA-2A) bzw. Glutamatdecarboxylase 65 (GADA). Außerdem sollten in der Familienanamnese keine T1D-Fälle bekannt sein. Um eine möglichst repräsentative Kontrollpopulation zu untersuchen, wurden in die Studie nur Kontrollpersonen mit mindestens einem T1D assoziierten HLA-Allel (HLA-DR3, -DR4, -DQ8, -DQ2) aufgenommen. Das Durchschnittsalter betrug 35 (±10,4) Jahre (Tab. 2).

Tabelle 2: Charakteristika (Alter, Diagnose, HLA-Haplotypen und Antikörper-Titer) der untersuchten Probanden. nd. = nicht bestimmt, f = weiblich, m = männlich, EM = erstmanifestiert, T1/2D = Typ 1/2 Diabetes, KP = Kontrollpersonen, Ak+ = Antikörper positive, + = positiv, - = negativ

Diagnose	*Proband*	*Geschlecht*	*Alter [Jahre]*	*HLA-DRB1*	*HLA-DQB1*	*GADA [KU/l]*	*IA-2A [KU/l]*	*IAA [µU/l]*	*ICA [JDFU]*
T1D-EM	1	m	25	*0301,0401	*02,0302	+	+	-	+
T1D-EM	2	m	33	*0301,0401	*02,0302	+	-	-	+
T1D-EM	3	f	23	*0301,0404	*02,0302	+	+	-	+
T1D-EM	4	m	10	*0401,0402	*0301,0302	+	+	-	+
T1D-EM	5	m	36	*0301,0401	*02,0302	+	-	-	+
T1D-EM	6	f	32	*0301,0401	*02,0302	+	+	+	+
T1D-EM	7	f	40	*0301,0401	*02,0302	+	+	-	+
T1D-EM	8	f	21	*0401,0401	*0301,0302	nd.	nd.	nd.	nd.
T1D-EM	9	m	40	*0401,0402	*0302,-	+	+	-	-
T1D-EM	10	f	22	nd.	nd.	-	-	-	-
T1D-EM	11	m	48	nd.	nd.	+	-	+	-
T1D-EM	12	f	28	nd.	nd.	+	-	+	-
T1D-EM	13	f	19	*3,4	nd.	-	-	-	-
T1D-EM	14	m	16	nd.	nd.	+	+	+	-
T1D-EM	15	m	61	*0401,0404	*0302,-	+	-	+	-
T1D-EM	16	m	26	0301,-	02,-	+	-	-	+
T1D>1J	17	m	29	*0401,0401	*0302,0301	+	+	+	+
T1D>1J	18	f	37	*0801,1601	*0302,0502	nd.	nd.	nd.	nd.
T1D>1J	19	m	29	*0401,0401	*0302,0301	+	+	+	+
T1D>1J	20	m	41	*0301,0401	*02,0302	-	-	-	-
T1D>1J	21	m	31	*0301,0401	*02,0302	+	-	+	-
T1D>1J	22	f	nd.	*0301,0401	*02,0302	+	-	-	-
T1D>1J	23	f	27	*0401,0701	*02,0302	+	-	+	-
T1D>1J	24	m	37	*0401,0401	*0302,0302	+	+	+	-
KP	25	m	32	*0401,0301	*0302,0201	-	-	-	-
KP	26	f	44	*0301,0401	*02,0302	-	-	-	-
KP	27	f	27	*0401,1301	*0302,0603	-	-	-	-
KP	28	f	43	*0401,1601	*0502,0302	nd.	nd.	nd.	nd.
KP	29	f	25	*1501,0401	*0302,0602	-	-	-	-
KP	30	f	38	*0401,1301	*0301,0603	-	-	-	-
KP	31	f	42	16,16	*0602	-	-	-	-
KP	32	f	27	*0401	*0301	nd.	nd.	nd.	nd.
KP	33	m	59	*4,1	nd.	-	-	-	-
KP	34	f	24	*0408,0701	*0302,0303	-	-	-	-
KP	35	m	29	1501,0403	*0302,0602	-	-	-	-
KP	36	f	30	*0301,0701	*02,02	-	-	-	-
T2D	37	f	69	*1001,1501	*0501,0602	-	-	-	-
T2D	38	f	75	*0801,1301	*0402,0603	-	-	+	-
T2D	39	f	50	*0701,1201	*02,0603	-	-	-	-
T2D	40	m	60	nd.	nd.	-	-	-	-
Ak+	41	m	30	*0401,-	*0302,-	+	+	+	+
Ak+	42	m	30	*0402,1301	*0302,0603	+	+	+	+
Ak+	43	f	26	*3,2	nd.	-	-	+	-

2.1.2 Untersuchungsgruppe T1D: Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus

Die Patienten der Untersuchungsgruppe „T1D“ (n=24) wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung größtenteils stationär in der Sektion Endokrinologie des Universitätsklinikums Ulm behandelt. Die Einschlusskriterien dieser Gruppe waren eine gesicherte Diagnose des Typ 1 Diabetes mellitus gemäß den Kriterien der World Health Organisation (WHO), sowie ein nachgewiesen positiver Autoantikörper-Titer von mindestens einem Autoantikörper (ICA, IAA, IA-2A, GADA). Diese Gruppe wurde nochmals unterteilt. Bei den Patienten mit erst-manifestiertem T1D (T1D-EM; n=16) lag die Manifestation zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie höchstens einen Monat zurück. Die andere Gruppe umfasste T1D-Patienten (n=8), die seit über einem Jahr an T1D erkrankt waren. Bei den frisch manifestierten T1D-Patienten handelte es sich um Patienten, die im Rahmen der Erst-Manifestation stationär behandelt wurden. Das Material von T1D-Patienten >1 Jahr stammte zum großen Teil aus der Diabetesklinik, Bad Mergentheim. Das Durchschnittsalter in dieser Gruppe T1D-EM betrug 29,1 ± 13 Jahre, das der Gruppe (T1D) 33 ± 5,3 Jahre (Tab. 2).

2.1.3 Untersuchungsgruppe T2D: Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus

Die Patienten der Untersuchungsgruppe „T2D“ (n=4) wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung ebenfalls stationär in der Sektion Endokrinologie des Universitätsklinikums Ulm behandelt. Auch hier war das Einschlusskriterium eine gesicherte T2D Diagnose gemäß den Kriterien der WHO. Außerdem sollten keine T1D-Fälle in der Familienanamnese der T2D-Patienten vorkommen. Das Durchschnittsalter in dieser Gruppe betrug 63,5±10,9 Jahre (Tab. 2).

2.1.4 Untersuchungsgruppe Ak+: Probanden ohne manifestierten T1D aber positiven Antikörper-Titer

In die Untersuchungsgruppe „Ak+“ konnten drei Probanden (Tab. 2) eingeschlossen werden. Für die Einschlusskriterien sollte kein manifester T1D, aber dennoch ein erstes Anzeichen einer autoimmunen Reaktion, die sogenannte prädiabetische Phase, die durch positive Titer der Autoantikörper gekennzeichnet ist, nachweisbar sein. Ein Proband entstammte der *Ulmer Schulkinder-Studie* [25] von 1990 und war 30 Jahre alt. Die beiden anderen Probanden wurden zufällig bei einer Routineuntersuchung entdeckt und waren 30 bzw. 26 Jahre alt.

2.1.5 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC= Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Aus den in Heparin (Heparin-Natrium Braun“Multi“ 10 000 I.E./ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgenommenen Blutproben der Probanden wurden Plasma, PBMC und DNA gewonnen. Das Blut wurde dafür zunächst bei 2500 rpm zentrifugiert. Die obere Phase (Plasma) wurde abgenommen und für die Antikörperbestimmung bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wurde das Blut mit Penizillin/Streptomycin-haltigem RPMI Medium (Gibco BRL Life Technologies, Gaithsburg, USA) im Verhältnis 1:2 versetzt. Das verdünnte Blut wurde vorsichtig über das durch eine Fritte getrennte Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) geschichtet. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten der Blutbestandteile ergaben sich nach einem Zentrifugationsschritt von 20 min bei 2500 rpm ohne Bremse vier Schichten: Plasma bzw. Medium, ein PBMC-Ring, Ficoll-Paque™ Plus und ein Blutkuchen (Abb. 1). Mit einer 2 ml Pipette konnten nun die PBMC abgeerntet werden. Nach einem Waschschritt und Anfärben eines kleinen Aliquotes mit Türkscher Lösung (Merck Diagnostica, Darmstadt, Deutschland) wurden die erhaltenen PBMC in einer Neubauer Zählkammer (Superiour Laboratory Glassware, Marienfeld, Deutschland) gezählt. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die PBMC entweder sofort verwertet oder eingefroren. Dabei wurden jeweils 10 Mio. PBMC in jeweils 1 ml Einfriermedium (40% Humanserum (Bio Whittacker, Cambrex Company, Walkersville, Maryland, USA)

und 20% DMSO (Sigma Biosciences, St. Louis, USA)) aufgenommen. Die Aliquote wurden in beschrifteten Einfrier-Röhrchen (Cryotube™ Vials, NUNC™ Brand Products, Dänemark) bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

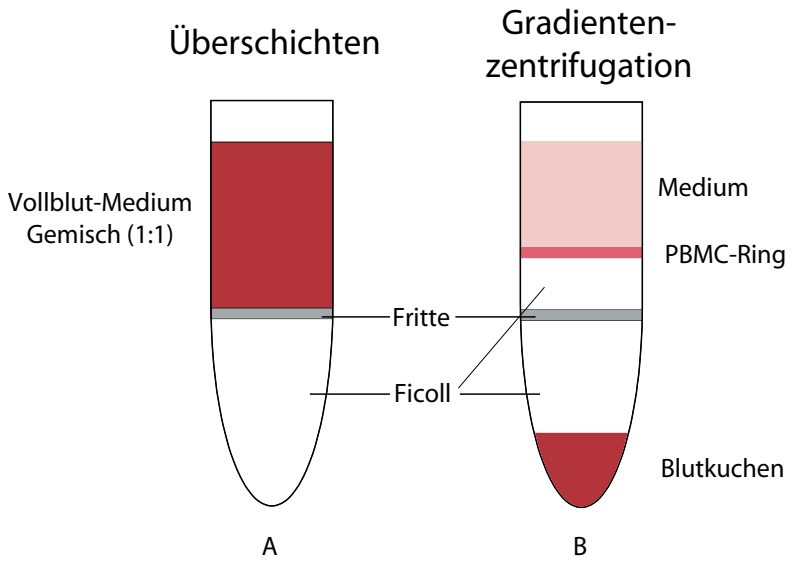


Abbildung 1: Lymphozyten-Isolation mittels Ficoll-Paque™ Plus Dichte-Gradientenzentrifugation.

2.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Ein 10 µl Aliquot der isolierten PBMC wurde im Verhältnis 1:10 mit *Türkscher Lösung* (Merck Diagnostica, Darmstadt, Deutschland) verdünnt und auf die vorbereitete Zählkammer pipettiert. *Türksche Lösung* färbt tote Zellen blau-rosa an. Intakte Zellen sind kreisrund und leuchten hell. Für die Bestimmung der PBMC Menge wurden alle vier großen Eckquadrate (Abb. 2, blau), die wiederum in 16 kleinere Quadrate aufgeteilt sind, bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt und der Mittelwert der vier erhaltenen Ergebnisse gebildet. Die Zellzahl wurde aus der folgenden Gleichung ermittelt:

Mio. Zellen/ml =
Zellzahl (Mittelwert) x Verdünnung (10) x Volumen [ml] x Kammerfaktor (0,01)

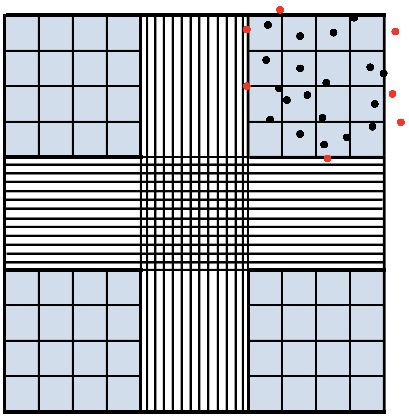


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Neubauer Zählkammer bei 10-facher Vergrößerung.

2.1.7 Bestimmung der Autoantikörper-Titer

Zur Bestimmung der Autoantikörper (AAk)-Titer wurde das aus der PBMC-Isolierung erhaltene Plasma zunächst durch Zugabe von DADE®-Thrombin (DADE Behring, Marburg, Deutschland) im Verhältnis 1:100 in Serum umgewandelt. Innerhalb von fünf Stunden unter ständigem Drehen koagulieren dabei die für die AAk-Bestimmung störenden Proteine. Nach Zentrifugierung (10 min, 3500 rpm) konnte das Serum von den störenden Proteinen (Pellet) getrennt werden.
Die Bestimmung der Serum-Titer von den Autoantikörpern gegen Glutamatdecarboxylase (GADA) und Tyrosinphosphatase (IA-2A) erfolgte mittels eines „fluid-phase antigen binding Assays" mit ^{125}Jod markierten Autoantigenen [166]. Die Autoantikörper-Titer gegen Insulin (IAA) wurden in einem kompetitiven „fluid-phase antigen binding Assay" ermittelt. Die Autoantikörper-Titer gegen IA-2 und GAD sind als *Karlsburg Einheiten* pro Liter [KU/L] angegeben, die IAA-Titer als µU pro Liter [µU/L] [155]. Die Bestimmung von ICA erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz an Cryoschnitten des humanen Pankreas [166] und sind als JDFU Einheiten (Juvenile Diabetes Foundation Units) dargestellt. Für die Bestimmung der Schwellenwerte [155] für einen positiven AAk-Titer wurde gemäß allgemeiner Übereinkunft die 99ste Perzentile des

AAk-Titers einer Kontrollgruppe herangezogen [155]. Die ermittelten Grenzwerte sind in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3: Grenzwerte für die Bestimmung der Autoantikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GADA), Tyrosinphosphatase (IA-2A), Insulin (IAA) und Inselzellgewebe (ICA) [155].

	ICA [JDFU]	*IAA [µU/l]*	*GADA [KU/l]*	*IA-2A [KU/l]*
Grenzwert	20	281,48	3,9	1,85

2.1.8 Bestimmung der HLA (Human Leucocyte Antigen)-Allele

Bei allen Probanden wurde zusätzlich zu dem in Heparin abgenommenem Blut noch eine 2,5 ml EDTA-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen. Die HLA-Bestimmung aus EDTA-Blut erfolgte über eine PCR mit spezifischen DR- bzw. DQ-Primern [59]. Dabei wurden die HLA-Klasse-II Allele DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DPB1, DQA1, DQB1 und die Klasse-I Allele A und B bestimmt. In Tab. 2 sind die T1D-assoziierten Klasse-II HLA-Haplotypen der untersuchten Probanden dargestellt.

2.1.9 Antigene

Sowohl für die Kurzzeit-Tests der verschiedenen Zellsubpopulationen als auch für die durchflusszytometrischen Messungen und Generierungen von T-Zell-Linien wurden jeweils die gleichen Antigene für die Stimulation verwendet. Das Autoantigen (Pro)Insulin (PI, I) wurde von der Firma Eli Lilly & Co (Greenfield, USA) zur Verfügung gestellt. Für die Definierung von Epitopen wurden 21 überlappende Peptide (H. Kalbacher, Med-Nat.wiss. Forschungszentrum der Universität Tübingen, Deutschland) des PräProInsulin Moleküls synthetisiert (Tab. 4).

Tabelle 4: Aminosäure Sequenz, Position und Länge der verwendeten PräProInsulin-Peptide. SS = Signalsequenz, B = B-Kette, C = C-Peptid, A = A-Kette, p = Peptid; alle Aminosäuren (AS) der Sequenzen werden nach dem internationalen Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

Nr.	*Position*	*Aminosäure-Sequenz*	*Länge in AS*
p1	SS1-16	MALWMRLLPLLALLAL	16
p2	SS5-20	MRLLPLLALLALWGPD	16
p3	SS9-24	PLLALLALWGPDPAAA	16
p4	SS13-B4	LLALWGPDPAAAFVNQ	16
p5	SS17-B8	WGPDPAAAFVNQHLCG	16
p6	SS21-B12	PAAAFVNQHLCGSHLV	16
p7	B1-16	FVNQHLCGSHLVEALY	16
p8	B6-22	LCGSHLVEALYLVCGER	17
p9	B11-27	LVEALYLVCGERGFFYT	17
p10	B16-32	YLVCGERGFFYTPKTRR	17
p11	B20-C4	GERGFFYTPKTRREAED	17
p12	B25-C9	FYTPKTRREAEDLQVGQ	17
p13	B30-C14	TRREAEDLQVGQVELGG	17
p14	C3-19	EDLQVGQVELGGGPGAG	17
p15	C8-24	GQVELGGGPGAGSLQPL	17
p16	C13-29	GGGPGAGSLQPLALEGS	17
p17	C18-A1	AGSLQPLALEGSLQKRG	17
p18	C23-A6	PLALEGSLQKRGIVEQC	17
p19	C28-A11	GSLQKRGIVEQCCTSIC	17
p20	A1-17	GIVEQCCTSICSLYQLE	17
p21	A5-21	QCCTSICSLYQLENYCN	17

Die Peptide waren 16-17 Aminosäuren (AS) lang und überlappten sich jeweils um 12 AS, so dass die gesamte Sequenz des PräProInsulins (PPI, Abb. 3) abgedeckt war.

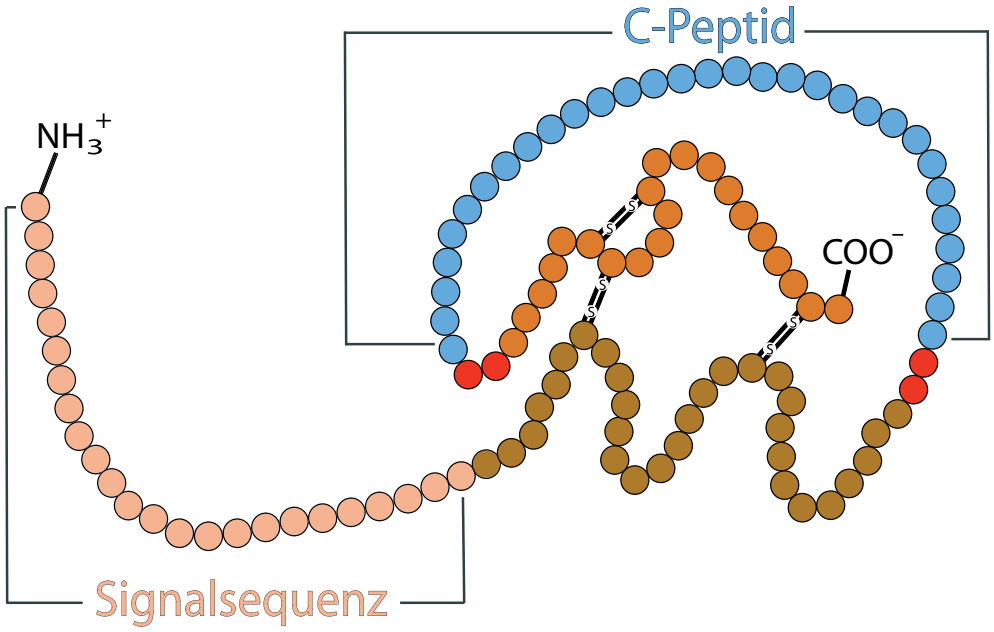


Abbildung 3: Schematische Darstellung des PräProInsulin Moleküls. Hellrot: Signal-Sequenz; braun: Insulin-B-Kette; blau: Proinsulin-C-Peptid; orange: Insulin-A-Kette; rot: enzymatische Schnittstellen; s-s: Disulfidbrücken

Als Positivkontrolle wurde das Superantigen Tetanus Toxoid (Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark), als Kontrollpeptid ein inverses GAD-Peptid p256-275 mit der Sequenz AILRPLAAMGKKVEPFMKF verwendet.

Von PI-Peptid p17 (C18-A1) wurden in Kooperation mit *Dr. Kalbacher* Alanin-Scans synthetisiert, wobei jeweils eine Aminosäure dieses Peptides durch ein Alanin substituiert wurde (Tab. 5). Diese Substitution wurde an jeder Stelle des Peptides durchgeführt, so dass am Ende von dem 17-mer Ausgangspeptid 16 verschiedene Peptide entstanden. Alle verwendeten Peptide wurden durch HPLC aufgereinigt, so dass eine Reinheit von über 95% erhalten wurde.

Tabelle 5: Aminosäure Sequenz der verwendeten Alanin Scan Peptide. Ala = Alaninsubstituiertes Peptid, p = Peptid; alle Aminosäuren (AS) der Sequenzen werden nach dem internationalen Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

Nr.	*Sequenz*	*AS-Position d. Substitution*
Ursprungssequenz (p17)	AGSLQPLALEGSLQKRG	-
Ala-p1	AASLQPLALEGSLQKRG	2
Ala-p2	AGALQPLALEGSLQKRG	3
Ala-p3	AGSAQPLALEGSLQKRG	4
Ala-p4	AGSLAPLALEGSLQKRG	5
Ala-p5	AGSLQALALEGSLQKRG	6
Ala-p6	AGSLQPAALEGSLQKRG	7
Ala-p7	AGSLQPLAAEGSLQKRG	8
Ala-p8	AGSLQPLALAGSLQKRG	10
Ala-p9	AGSLQPLALEASLQKRG	11
Ala-p10	AGSLQPLALEGALQKRG	12
Ala-p11	AGSLQPLALEGSAQKRG	13
Ala-p12	AGSLQPLALEGSLAKRG	14
Ala-p13	AGSLQPLALEGSLQARG	15
Ala-p14	AGSLQPLALEGSLQKAG	16
Ala-p15	AGSLQPLALEGSLQKRA	17

2.2 Zellkultur

2.2.1 Austesten des Humanserums

Um einer unspezifischen Stimulation der T-Lymphozyten durch das verwendete Humanserum vorzubeugen, wurde dieses zunächst ausgetestet. Dazu wurde die GAD65-spezifische T-Zell-Linie 6/7 [58] sowohl mit „unserem“ Humanserum (Bio Whittacker, Cambrex Company, Walkersville, Maryland, USA) als auch in einem von *Dr. Endl* bereits ausgetesteten Humanserum (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) mit GAD65

(10 µg/ml) restimuliert (siehe Kapitel 2.2.3). In beiden Ansätzen zeigten die Negativkontrollen keinerlei unspezifische Stimulation. Hingegen kam es bei beiden Versuchen nach Stimulation mit GAD65 zu einer deutlichen Proliferation, was durch Aggregationen von Blasten gekennzeichnet war. Aufgrund dieser Vorversuche konnte das Humanserum von Bio Whittacker bedenkenlos in allen Versuchen verwendet werden.

2.2.2 Selektion verschiedener PBMC-Subpopulationen

Selektion naiver ($CD4^+CD45RA^+$) und Memory ($CD4^+CD45RO^+$) T-Zellen
Für die Untersuchung der antigenspezifischen Reaktion von PBMC und verschiedenen T-Helfer-Subpopulationen musste zunächst eine Selektion der benötigten Subpopulationen erfolgen. Dazu wurden zuerst die $CD4^+$ T-Zellen mittels eines $CD4^+$ T-Zell-Isolations-Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) gewonnen. Dafür wurden alle $CD4^-$ Zellen (zytotoxische T-Zellen, Monozyten, Granulozyten, B-Zellen, Thrombozyten, frühe Erythrozyten-Precursor-Zellen, NK-Zellen) indirekt mit Hapten-modifizierten CD8-, CD11b-, CD16-, CD19-, CD36- und CD56-Antikörpern (Miltenyi Biotec) inkubiert. Durch anschließende Zugabe von Anti-Hapten-MicroBeads (Miltenyi Biotec) konnten die $CD4^+$ T-Zellen im magnetischen Feld über eine LS Säule (Miltenyi Biotec) von den $CD4^-$ Zellen getrennt werden (negative Selektion). Die $CD4^-$ Zellen blieben aufgrund der MicroBeads in der Säule hängen, während die $CD4^+$ T-Zellen durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer (siehe Anhang) von der Säule eluiert werden konnten.
Anschließend wurden die $CD4^+$ T-Zellen durch Zugabe von CD45RA MicroBeads (Miltenyi Biotec) und erneuter Auftrennung im magnetischen Feld in $CD4^+CD45RA^+$ bzw. $CD4^+CD45RA^+RO^+$ doppelpositive und $CD4^+CD45RO^+$ T-Zellen aufgetrennt. Dabei wurden die $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen durch Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld und Spülen mit MACS-Puffer unter Druck gewonnen (positive Selektion).

Selektion von T-Zellen mit bestimmten T-Zell-Rezeptor Vβ-Familien
Hierzu wurden T-Zellen zunächst mit FITC-markierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden und kommerziell erhältlichen Vβ-Familien (Serotec, Kidlington, Oxford, UK) gefärbt. Jeweils 1 Mio. T-Zellen wurden dabei mit 5 µl Anti-Vβ und 100 µl MACS-Puffer (siehe Anhang) resuspendiert und für 20 min bei +6-12 °C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit MACS-Puffer wurden die gefärbten T-Zellen mit 20 µl

anti-FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) und 80 µl MACS-Puffer inkubiert. Nach 15 min Inkubation bei +6-12 °C und einem erneuten Waschschritt wurden die T-Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und im magnetischen Feld über eine LS Säule (Miltenyi Biotec) getrennt (siehe oben). In der positiv selektierten Fraktion waren die Vβ-positiven T-Zellen angereichert, die dann für Stimulationsversuche zur Verfügung standen.

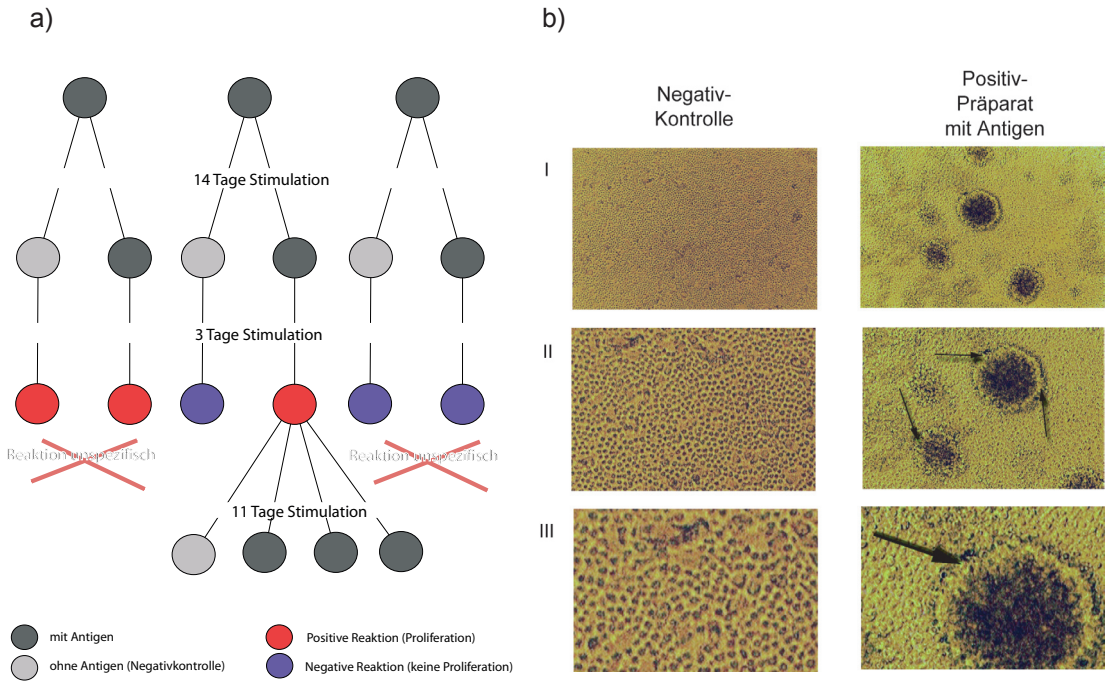
2.2.3 Kurzzeitstimulation

Bei Versuchen nach einmaliger Stimulationsperiode wurden zunächst entweder 150 000 PBMC oder 100 000 autologe bzw. HLA-gematchte, bestrahlte (40 Gy) antigenpräsentierende Zellen (APC) auf 96 Well Rundbodenplatten (Corning incorporated Costar®, New York, USA) verteilt. Anschließend wurden die Zellen (PBMC, APC) mit 5-10 µg/ml Antigen (PI, I, B-Kette, A-Kette, p1-21) bzw. nur mit Kulturmedium (siehe Anhang) als Negativkontrolle „stimuliert". Zu den APC wurden anschließend noch 20 000-40 000 T-Zellen der verschiedenen Subpopulationen zugegeben (siehe Kapitel 2.2.2). Nach 5-6 Tagen Inkubation im Brutschrank (+37 °C und 6% CO_2) wurden die Überstände für die Zytokinbestimmung abgenommen. Mit den verbleibenden Zellen wurde entweder ein Proliferations-Assay (siehe Kapitel 2.3.1) oder ein FACS (Fluorescence-Activating Cell Sorter)-Assay (siehe Kapitel 2.4.3) durchgeführt.

2.2.4 Methoden der T-Zell-Kultivierung

Die Primärstimulation von PBMC erfolgte zunächst wie die Kurzzeitstimulation (siehe Kapitel 2.2.3). Am 7. Tag nach der Primärstimulation wurde zu allen Proben der Wachstumsfaktor Interleukin-2 (20 U/ml rhIL-2; Boehringer-Mannheim, Deutschland) dazugegeben. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und mit frischem IL-2 versehen (Expansion). Nach 14 Tagen konnte das erste Mal restimuliert werden. Dabei erfolgte die Generierung von T-Zell-Linien mittels der Split-Well Methode nach *Pette* (Abb. 4) [131].

Abbildung 4: a) Schematische Darstellung des „Split-Well"-Verfahrens nach *Pette* [131] b) Kriterien für die Beurteilung einer richtigen Negativkontrolle bzw. einer spezifischen Proliferation. Dargestellt sind hierbei drei verschiedene Vergrößerungen (I-III). Der Pfeil weist jeweils auf stark vergrößerte Zellen (Blasten) in einer Proliferationsaggregation bestehend aus vielen aktivierten Zellen hin.



Hierzu wurden die Mikrokulturen, die nach der Primärstimulation eine Proliferation zeigten, zunächst vom IL-2 befreit und anschließend auf zwei Wells aufgeteilt. Ein Well wurde mit ungepulsten, bestrahlten APC „stimuliert" (Negativkontrolle). In das andere Well wurden mit Antigen gepulste APC gegeben. Nach 3 Tagen erfolgte wiederum eine Zugabe von 20 U/ml rhIL-2.

Die Restimulationen erfolgten alle 14-16 Tage. Dabei wurden stets nur die Proben restimuliert, die nach Antigenstimulation deutlich stärker proliferierten im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle (Abb. 4b). Bei jeder Restimulation wurde mindestens ein Well mit einer Negativkontrolle belegt, um eine ständige Kontrolle der Spezifität der T-Zell-Linien zu erhalten. Eine Expansion der T-Zellen erfolgte durch IL-2-Zugabe und, je nach Zellzahl, Überführen der Zellen in 96 Well Flachboden-, 48 Well- bzw. 24 Well-Platten (Falcon, Becton Dickinson, Le Pond De Claix, Frankreich).

2.2.5 Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Als APC wurden entweder autologe PBMC oder HLA-identische dendritische Zellen, die uns von Herrn *B.O. Roep* zur Verfügung gestellt wurden, benutzt. Nach Auftauen der meist eingefrorenen autologen APC wurde eine Konzentration von 10 Mio./ml eingestellt. Pro Well wurden 0,1 Mio. (entspricht 10 µl) APC eingesetzt. Für die Beladung der APC mit den Antigenen wurden die 10 µl APC mit den untersuchten Konzentrationen an Antigen für drei Stunden im Brutschrank (+37 °C, 6% CO_2) inkubiert (Antigenpuls). Als Negativkontrolle dienten gleichbehandelte APC ohne Antigenpuls. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Zellen mit 40 Gy bestrahlt, um einer störenden Proliferation der APC entgegenzuwirken. Anschließend wurde die APC-Suspension im Verhältnis 1:5 mit Kulturmedium (siehe Anhang) verdünnt. Dies sollte eine mögliche Autopräsentation der Peptide durch die später hinzugefügten T-Zellen, die zu einer Apoptoseinduktion führen könnte, minimieren. Zum Schluss wurden die jeweiligen APC zu je 50 µl (= 0,1 Mio. Zellen) auf 96 Well Rundbodenplatten (Corning incorporated Costar®, New York, USA) verteilt. Die Vorbehandlung der dendritischen Zellen (DC) erfolgte auf ähnliche Weise. Es wurden lediglich nur 20 000 DC auf 96 Well Flachbodeplatten ausplattiert. Die Zugabe der T-Zellen erfolgte sofort, ohne die DC davor zu bestrahlen.

2.2.6 Präparation der T-Zellen

Die T-Zellen wurden vor der Restimulation zweimal mit Kulturmedium gewaschen, um noch enthaltenes IL-2 zu eliminieren. Nach dem Waschschritt wurden die Zellen gezählt und zu je 20 000 Zellen á 50 µl Kulturmedium auf die Wells verteilt.

2.2.7 Limiting Dilution

Sechs bis sieben Tage nach einer Restimulation konnte eine spezifische T-Zell-Linie kloniert werden. Hierzu wurden teilweise HLA-gematchte APC, ohne sie mit Anti-

gen zu pulsen, in Klonierungsmedium (siehe Anhang) aufgenommen, bestrahlt und zu je 10 000 Zellen auf 96 Well Rundbodenplatten (Corning incorporated Costar®, New York, USA) verteilt. Die Ablage der T-Zell-Linie zu den APC erfolgte in einer seriellen Verdünnung mit Klonierungsmedium von 10, 5, 2,5 und 1,25 Zellen/Well. Nach ca. 7 Tagen (5-9) konnten in einigen Wells erste Anzeichen von Proliferationen festgestellt werden. Diese Wells wurden dann nach vollständigem Entfernen des Klonierungsmediums mittels des Splitt-Well-Verfahrens [131] restimuliert und weiter expandiert.

2.3 Charakterisierung von Zellsubpopulationen und T-Zell-Linien

2.3.1 Proliferations-Assay

Die Proliferation konnte über die Inkorporation von ^{3}H-Thymidin (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) in die DNA sich teilender Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden die mit Antigen für 3-5 Tage inkubierten Zellen in einer 96 Well Rundbodenplatte (Corning incorporated Costar®, New York, USA) mit ^{3}H-Thymidin im Überschuss (1 µCi/Well) versehen und für weitere 16-18 h im Brutschrank (+37 °C, 6% CO_2) inkubiert. Dabei wurden PBMC zu je 150 000 Zellen bzw. T-Zellen zu je 20 000 plus 100 000 APC eingesetzt. Nach 16-18 h wurden die Zellen über einen Harvester (Packard Bioscience, Niederlande) auf eine Glasfaserfilterplatte (Unifilter®-96, GF/C®, Packard Bioscience) abgeerntet und 6-7 mal mit H_2O bzw. einem finalen Mal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die in die DNA eingebaute und auf der Filterplatte verbleibende Radioaktivität wurde anschließend mit jeweils 30 µl Szintilationsflüssigkeit (Microscint™, Packard Bioscience) versetzt. Durch die Flüssigkeit wurde das ^{3}H-Thymidin angeregt Lichtblitze zu erzeugen, die dann in einem β-Strahlungszähler (Top Count™, Packard Bioscience) gemessen werden konnten. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI) von Doppelwerten bzw. Triplikaten bestimmt. Der SI setzte sich aus dem Verhältnis aus eingebautem ^{3}H-Thymidin aus dem Ansatz mit Antigen zu ohne Antigen zusammen.

2.3.2. Zytokinbestimmungen

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
Durch den ELISA wurden aus Zellkultur-Überständen die Menge an den nach Stimulation mit Antigenen sezernierten Zytokinen Interferon γ (IFNγ), Tumornekrosefaktor α (TNFα), Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10 bestimmt. Dazu wurden zunächst Microtestplatten (F96 Maxisorb-Immunoplate, NUNC™ Brand Products, Dänemark) mit 50 µl des jeweiligen in Tris-HCl (siehe Anhang) aufgenommenen Anti-Zytokin Antikörpers (2 µg/ml Endkonzentration, Pharmingen, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) belegt. Nach einer zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde mit einer 3 %-igen BSA-Lösung (siehe Anhang) geblockt, um die freien Proteine abzusättigen. Nach weiteren zwei Stunden bei RT wurden Zellkulturüberstände zu je 50 µl als Doppelwerte aufgetragen. Für die Ermittlung einer Standardkurve wurde jeweils eine Platte mit einer Verdünnungsreihe des jeweiligen Zytokinstandards (Pharmingen) als 8-fach Bestimmung aufgetragen. Nach einer Über-Nacht-Inkubation bei +4° C wurden die Proben viermal mit Waschpuffer (siehe Anhang) gewaschen und ein zweiter biotinylierter Anti-Zytokin Antikörper in 3 %-iger BSA-Lösung aufgenommen (0,5-1 µg/ml Endkonzentration, Pharmingen) und à 50 µl aufgetragen. Nach einer einstündigen Inkubation und fünfmaligem Waschen erfolgte die Bindung des Biotins des zweiten Antikörpers durch Hinzufügen der in 0,3 %-iger BSA-Lösung aufgenommenen alkalischen Streptavidin-gebundenen Phosphatase (Dianova, Hamburg, Deutschland). Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von 50 µl des Substrats P-Nitrophenylphosphatin (1 mg/ml, Fluka, Buchs, Schweiz) in Ethylendiaminpuffer (siehe Anhang) entwickelt, wobei sich eine entsprechend der in den Proben bzw. dem Standard enthaltenen Zytokinmenge mehr oder weniger starke Gelbfärbung zeigte. Die Entwicklungs-Phase wurde nach 15 min durch Zugabe von 50 µl EDTA-Lösung (siehe Anhang) abgestoppt. Die Messung der Intensität der Färbung konnte anschließend mit in einem ELISA-Reader (Spectra Max 250, MWG-Biotech, Molecular devices, München, Deutschland) bei 405 nm gemessen und mit der Pro-Soft-Max 3.1 Software (Molecular devices) ausgewertet werden. Die Zytokinmengen wurden jeweils in pg/ml nach abgezogener Negativkontrolle angegeben.

Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Hierzu wurden T-Zellen wie unter Kapitel 2.2.3, für 16-18 h in einem Endvolumen von 200 µl mit Antigenen [10 µg/ml] stimuliert. Nach dieser Inkubation werden 10 µl Brefeldin A (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) dazugegeben. Nach weiteren 5 h Inkubation im Brutschrank wurden 150 µl Medium abgenommen und verworfen. Durch Zugabe von 100 µl 20 mM EDTA-Lösung (siehe Anhang) wurde die Brefeldin A bedingte Reaktion abgebrochen. Anschließend erfolgte eine Überführung der Proben in eine 96 W-Spitzbodenplatte. Nach drei Minuten Zentrifugierung bei 1400 rpm wurde der Überstand dekantiert. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 150 µl phosphatgepufferter Lösung (PBS) und anschließender Zentrifugierung. Anschließend inkubierten die Proben für 5 min mit jeweils 150 µl 4%-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (siehe Anhang). Nach Abzentrifugieren wurden die Proben mit einer 1 %-igen BSA-Lösung geblockt. Nach erneuter Zentrifugierung wurden die Proben mit jeweils 150 µl Cyto-FM Lösung (siehe Anhang) versehen und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Nach Auftauen der Proben erfolgten zunächst zwei Waschschritte mit PBS. Danach wurden die Proben für 10 min im Dunkeln mit einer 1:10 mit H_2O verdünnten Permeabilisierungslösung (Becton Dickinson (BD), San Jose, Kalifornien, USA) inkubiert. Nach zwei Waschschritten erfolgte die FACS-Färbung. Hierzu wurden die Proben für 40 min im Dunkeln bei RT mit einer Ak-Mischung (siehe Tab. 6) bzw. einer Isotypkontrolle in 50 µl FACS-Puffer II (siehe Anhang) inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgten zwei Waschschritte. Anschließend wurden die Proben in 150 µl FACS-Puffer II aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 6: Antikörpermischung verschiedener Ansätze zur intrazellulären Färbung von Zytokinen. Mit Ausnahme der APC-konjugierten Antikörper (Pharmingen) stammten alle anderen von Becton Dickinson. Ig = Immunglobulin; IFN = Interferon; IL = Interleukin; FITC, PE, PerCP, APC = verschiedenfarbig fluoreszierende Konjugate

Ansatz	*FITC*	*PE*	*PerCP*	*APC*
1	7,5µl IFNγ	5µl CD4	5µl CD3	-
2	5µl CD4	7,5µl IL-4	5µl CD3	5µl IL-10
Isotypkontrolle	5µl IgG2b	5µl IgG1	5µl IgG1	5µl IgG2a

ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot)
Durch den ELISPOT wurde die Menge der Zellen, die nach Stimulation mit Antigenen die Zytokine Interferon γ (IFNγ), und IL-4 sezernierten bestimmt. Dazu wurden zunächst 96 Well Multiscreen™ Platten (Millipore Corporation, Bedford, USA) mit 100 µl des jeweiligen in steriler PBS-Lösung (siehe Anhang) aufgenommen anti-Zytokin Antikörpers (4 µg/ml Endkonzentration, Endogen, Woburn, USA) belegt. Nach einer Über-Nacht Inkubation im Brutschrank (+37 °C, 6% CO_2) wurde dreimal mit jeweils 200 µl PBS-Lösung gewaschen, bevor mit einer 1 %-igen sterilen BSA-Lösung (siehe Anhang) für eine Stunde bei RT geblockt wurde. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Wells mit Zellen und Antigenen versetzt. Dazu wurden pro Well 200 µl Zellsuspension, bestehend aus 50 000 Zellen der Linie SD52.1c, 230 000 autologen PBMC und einer steigenden Konzentration an Antigen (Peptid C18-A1), auf die Wells verteilt. Als Positivkontrolle wurde Phytohämagglutinin (PHA) in einer Endkonzentration von 2 µg/ml verwendet. Hierbei wurden stets Doppelwerte angesetzt. Die anschließende Inkubation im Brutschrank betrug für den Nachweis von IFNγ 24 h und von IL-4 zwei Tage. Nach dieser Inkubationszeit wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des zweiten und biotinylierten Antikörpers (Endogen, Woburn, USA), der in 1%-iger BSA-Tween-Lösung verdünnt und in einer Endkonzentration von 2 µg/ml und in einem Endvolumen von 100 µl pro Well verteilt wurde. Nach einer weiteren Über-Nacht-Inkubation bei +4 °C wurden die Wells viermal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 100 µl einer Strep-HRP-Lösung versetzt (siehe Anhang). Nach einem weiteren Inkubationsschritt (2h im Brutschrank) erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer die Entwicklung durch Zugabe von jeweils 200 µl Entwicklungslösung (siehe Anhang). Die Entwicklungsdauer betrug bei Bestimmung von IFNγ ca. 10 min, bei IL-4 ca. 20 Minuten. Anschließend wurde die Entwicklungslösung unter fließendem Wasser abgewaschen. Nach Trocknen der Platten über Nacht im Dunkeln, erfolgte die Auswertung in einem ImmunoSpot Gerät und der ImmunoSpot Software (CTL Europe, Reutlingen, Deutschland).

2.3.3 Nachweis der Spezifität von T-Zell-Linien

Nachdem eine T-Zell-Linie ausreichend expandiert war, erfolgte am Ende eines Stimulationszyklus, d.h. nach 14-16 Tagen, neben einer erneuten Restimulation eine 3-tägige Stimulation der „T-Zell-Linien“ mit Antigen gepulsten autologen APC bzw. nur

Kulturmedium. Mittels Proliferations-Assay (siehe Kapitel 2.3.1) erfolgte der Nachweis der Spezifität von generierten T-Zell-Linien. Dabei wurden Doppelwerte bzw. Triplikate angesetzt. Eine weitere Charakterisierung der spezifischen T-Zell-Linien erfolgte durch Proliferations-Assays mit verschiedenen Konzentrationen des spezifischen Antigens, anderen oder z.T. modifizierten Peptiden (Alanin-Scan). Teilweise wurden auch Zellkultur-Überstände für die Bestimmung der sezernierten Zytokinmenge entnommen.

2.3.4 MHC-Restriktionsanalyse von T-Zell-Linien

Inhibitionstest

Zur Identifizierung der HLA-Allele, die an der Präsentation der Peptide beteiligt sind (Restriktionselemente), wurden verschiedene anti-HLA spezifische monoklonale Antikörper (MAK) in einem Proliferations-Assay eingesetzt (Tab. 8). Durch die MAK-wurden die jeweiligen Restriktionselemente blockiert. Dadurch wurde die Peptid-Bindung und im folgenden die Proliferation gehemmt.

Tabelle 7: Bezeichnung und Funktion der anti-HLA spezifischen monoklonalen Antikörper

Name	*Wirkung*	*Bindung*
L243	Anti-DR Antikörper	an DRA-Kette, die nicht polymorph ist
SPVL3 bzw.Tü22	Anti-DQ Antikörper	an DQA-Kette, die nicht polymorph ist
W32/6	Anti-Klasse-I Antikörper	

Hierzu wurden autologe APC aufgetaut und auf eine Zellzahl von 4 Mio. Zellen/ml eingestellt. Zunächst wurden jeweils 25 µl, d.h. 0,1 Mio. Zellen auf eine 96 Well Rundbodenplatte (Corning incorporated Costar®, New York, USA) verteilt. Danach wurden 25 µl der MAK in einer Endkonzentration von 20 µg/ml sowie eine Negativkontrolle (25 µl Kulturmedium) dazugegeben und für eine halbe Stunde im Brutschrank (+37 °C, 6% CO_2) inkubiert. Nach der Zugabe der MAK folgte die dreistündige Inkubation der APC mit den Antigenen (25 µl, Endkonzentration 2,5 µg/ml). Anschließend wurden

die APC wiederum bei 40 Gy bestrahlt, bevor als letztes die Zugabe der T-Zell-Linien (20 000 Zellen/Well) erfolgte. Nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank (+37 °C, 6% CO_2) wurde ^{3}H-Thymidin (1 µCi/Well) dazugegeben. Nach weiteren 16-18 h Inkubation wurde der Proliferations-Assay, wie oben beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden jeweils Triplikate gemessen.

Restriktionsanalyse mit transfizierten Maus-Fibroblasten

Eine genauere Untersuchung der HLA-DR-Restriktion wurde durch die Verwendung verschiedener adhärenter Maus-Fibroblasten-Linien (L-Zell-Linien) durchgeführt. Dabei wurden Maus-Fibroblasten mit den humanen HLA-Molekülen DRB4*0101 (L17.8) [85, 91] bzw. DRB1*0401 (DAP-3) [81] zusammen mit HLA-DRA1*0101 transfiziert. Zu Beginn des Versuches wurden jeweils 25 000 L-Zellen pro Linie und Well für fünf Stunden in einer 96 Well Flachbodenplatte (Falcon, Becton Dickinson, Le Pond De Claix, Frankreich) mit Antigen (5 µg/ml) bzw. Kulturmedium (Negativkontrolle) gepulst. Innerhalb dieser fünf Stunden zeigte sich eine Adhärenz der L-Zellen. Anschließend wurden die mit Antigen beladenen adhärenten L-Zellen mit 100 Gy in der Platte bestrahlt, bevor die T-Zell-Linien (50 000 Zellen/Well) dazugegeben wurden. Das Verhältnis von L-Zellen zu T-Zellen lag hier bei 1:2. Nach drei Tagen Stimulation im Brutschrank wurden die Überstände für die anschließende Zytokinbestimmung (ELISA) abgenommen. Eine positive Antigen-Präsentation konnte zusätzlich durch visuell erkennbare Lyse der L-Zellen durch die T-Zellen nachgewiesen werden.

Restriktionsanalyse mit transfizierten B-Zellen

Um eine zusätzliche Bestätigung der Restriktionsmoleküle zu erhalten wurde, der oben beschriebene Versuch mit EBV-transformierten B-Zell-Linien (BLS; VMRC, Seattle, USA) als APC durchgeführt. Ein Teil der EBV-transformierten B-Zell-Linien wurde direkt verwendet (BLS-unbehandelt). Mit dem anderen Teil wurde eine retrovirale Transfektion durchgeführt, wobei danach entweder die HLA-Moleküle DRB1*0401, DRB4*0101 oder DQ8 auf der Oberfläche exprimiert waren. Dabei galt die Reaktion mit der unbehandelten BLS als Negativkontrolle. Im Versuch wurden jeweils 50 000 B-Zellen pro Linie und Well für drei Stunden in einem 15 ml BlueCab-Röhrchen (Greiner GmbH Frickenhausen, Deutschland) mit Antigen (10 µg/ml) bzw. Kulturmedium (Negativkontrolle) gepulst. Anschließend wurden die mit Antigen beladenen B-Zellen mit 100 Gy bestrahlt. Die bestrahlten B-Zellen wurden à 50 µl zu je 50 000 Zellen pro Well verteilt, bevor 50 µl T-Zell-Linien (50 000 Zellen/Well) dazugegeben wurden.

Nach drei Tagen Stimulation im Brutschrank wurden die Überstände für die anschließende Zytokinbestimmung (ELISA) abgenommen. Eine positive Antigen-Präsentation konnte zusätzlich durch einen Proliferations-Assay (siehe Kapitel 2.3.1) nachgewiesen werden.

2.3.5 Peptidbindungsmotiv von T-Zell-Linien

Für die Bestimmung der Bindungselemente eines Peptides an das MHC-Molekül wurden von dem Proinsulin-Peptid C18-A1 (p17) Alanin-Scan Peptide verwendet. Hierzu wurden T-Zellen einer etablierten Linie für drei Tage mit den 16 verschiedenen Alanin-Scan-Peptiden (10 µg/ml) bzw. einer Negativkontrolle stimuliert (siehe auch Kapitel 2.2.3). Aus den Ergebnissen des anschließenden Proliferations-Assays (siehe Kapitel 2.3.1) konnte dann das Bindungsmotiv bestimmt werden. Zusätzlich wurden vor dem Proliferations-Assay Zellkulturüberstände für Zytokinbestimmungen abgenommen.

2.3.6 T-Zell-Rezeptor (TZR)-Analyse

RNA-Isolierung
Die Isolierung von Gesamt-RNA basierte auf der Methode der Guanidinium Thiocyanat Extraktion, wobei das Reagenz RNAzol®BD (Wak-Chemie MedIcal GmbH, Bad Soden, Deutschland) verwendet wurde. Mindestens 2 Mio. Zellen der untersuchten T-Zell-Linien und autologen PBMC wurden mit einem ml RNAzol® lysiert. Nachdem alle Zellen lysiert waren, erfolgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform (Fluka, Buchs, Schweiz). Das entstandene Gemisch wurde für ca. 30 sec durch wiederholtes vortexen in Emulsion gehalten, um einen optimalen Phasenaustausch zu gewährleisten. Nach anschließender Zentrifugierung (20 min, +4 °C, 14 000 rpm) wurde die oberste der drei entstandenen Phasen (wässrige Phase), in der sich die RNA-Fraktion befand, abpipettiert. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 500 µl 100%-igem Isopropanol (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und anschließender Zentrifugation (20 min, +4 °C, 14 000 rpm). Das erhaltene Pellet wurde abschließend in 1 ml 75%-igem Ethanol (Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland) gewaschen und nach Trocknen des Pellets in RNAse-freiem Wasser gelöst.

Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde ein Kit von Perkin Elmer (Weiterstadt, Deutschland) verwendet, dessen Reagenzien in Tabelle 8 dargestellt sind. Anschließend durchlief der Ansatz ein definiertes Temperaturprofil. Zunächst erfolgte die Hybridisierung der Oligo(dT) Primer (5 min. bei RT); danach kam die Synthesephase (20 min bei +42 °C) und zum Schluss die Denaturierung (5 min bei 99 °C). Die cDNA wurde anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 8 : Pippetiertschema für einen Ansatz der reversen Transkription.

Reagenz	*Menge*
Oligo(dT) Primer (50 µM, Perkin Elmer)	1 µl
10x PCR-Puffer II (Perkin Elmer)	2 µl
$MgCl_2$-Lösung (25 mM, Perkin Elmer)	4 µl
dNTP-Mix (10mM, Amersham Pharmacia, USA)	1 µl
RNAse-Inhibitor (20 U/µl, Perkin Elmer)	1 µl
MuLV (Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (50 U/µl, Perkin Elmer)	1 µl
RNA-Lösung (0,03-0,05 µg/µl)	10 µl

RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasechainreaktion)

Mittels einer familienspezifischen RT-PCR konnten die jeweils transkribierten T-Zell-Rezeptorfamilien bestimmt werden. Als Positivkontrolle wurde ein semi-homologer exogener Standard [105] zu jedem Versuchsansatz gegeben. Für die Bestimmung der TZR Vα- und TZR Vβ-Familien wurde das Primerpanel, das von *Manfras* [105] beschrieben wurde, übernommen (Tab. 9).

Tabelle 9: Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer für die Bestimmung der T-Zell-Rezeptor (TZR) α- bzw. β-Familien. TZRAV, TZRBV: 5´-Primer für variable Region der α-, β-Familien; TZRAC, TZRBC: fluoreszenzmarkierter 3´-Primer für konstante Region der α-, β-Familien; A = Adenosin; T = Thymidin; G = Guanosin; C = Cytidin.

TZRAV-Familie	*Primer Sequenz 5´-3´*	*TZRBV-Familie*	*Primer Sequenz 5´-3´*
TZRAV 1	GGCATTAACGGTTTTGAGGCTGGA	TZRBV 1	CACAACAGTTCCCTGACTTGCA
TZRAV 2	CAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGT	TZRBV 2	ATACGAGCAAGGCGTCGAGAAG
TZRAV 3	CCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTA	TZRBV 3	TACAGTGTCTCTAGAGAGAAG
TZRAV 4	TTGGTATCGACAGCTTCACTCCCA	TZRBV 4	CAACCTGGACAGAGCCTGACA
TZRAV 5	CGGCCACCCTGACCTGCAACTATA	TZRBV 5.1	GAGTGAGACACAGAGAAACAAA
TZRAV 6	TCCGCCAACCTTGTCATCTCCGCT	TZRBV 5.2	GCCCCAGTTTATCTTTCAGT
TZRAV 7	GCAACATGCTGGCGGAGCACCCAC	TZRBV 6	TCAGGTGTGATCCAATTTC
TZRAV 8.1	ATTCGTTCAAATGTGGGCGAAAAG	TZRBV 7	CCTGAATGCCCCAACAGCTCTC
TZRAV 8.2	ATTCGTTCAAATATGGACAAAAAG	TZRBV 8	TCTGGTACAGACAGACCATGAT
TZRAV 9	CCAGTACTCCAGACAACGCCTGCA	TZRBV 9	ACCTAAATCTCCAGACAAAGCT
TZRAV 10	CACTGCGGCCCAGCCTGGTGATAC	TZRBV 10	GCTCCAAAAACTCATCCTGTAC
TZRAV 11	CGCTGCTCATCCTCCAGGTGCGGG	TZRBV 11	AGAGAAGGGAGATCTTTCCTC
TZRAV 12	TCGTCGGAACTCTTTTGATGAGCA	TZRBV 12	GACAGAGGATTTCCTCCTCACT
TZRAV 13	TTCATCAAAACCCTTGGGGACAGA	TZRBV 13.1	GACCAAGGAGAAGTCCCCAA
TZRAV 14	CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT	TZRBV 13.2	TGGTGAGGGTACAACTGCCA
TZRAV 15	TTGCAGACACCGAGACTGGGGACT	TZRBV 14	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT
TZRAV 16	TCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTC	TZRBV 15	CTCGACAGGCACAGGCTAAA
TZRAV 17	TGGGAAAGGCCGTGCATTATTGAT	TZRBV 16	AGAGTCTAAACAGGATGAGTCC
TZRAV 18	CAGCACCAATTTCACCTGCAGCTT	TZRBV 17	ACTGTGACATCGGCCCAAAA
TZRAV 19	ACACTGGCTGCAACAGCATCCAGG	TZRBV 18	TGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA
TZRAV 20	TCCCTGTTTATCCCTGCCGACAGA	TZRBV 19	CTCAATGCCCCAAGAACGCAC
TZRAV 21	AGCAAAATTCACCATCCCTGAGCG	TZRBV 20	CCTCCAGCTGCTCTTCTACTC
TZRAV 22	CCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGA	TZRBV 21	GATTCACAGTTGCCTAAGGA
TZRAV 23	TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG	TZRBV 22	AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCCA
TZRAV 24	CTGGATGCAGACACAAAGCAGAGC	TZRBV 23	TCCAGGTCAGGACCCCCAGTT
TZRAV 25	TGGCTACGGTACAAGCCGGACCCT	TZRBV 24	CCCAGTTTGGAAAGCCAGTGACCC
TZRAV 26	AGCGCAGCCATGCAGGCATGTACC		
TZRAV 27	AAGCCCGTCTCAGCACCCTCCACA		
TZRAV 28	TGGTTGTGCACGAGCGAGACACTG		
TZRAV 29	GAAGGGTGGAGAACAGATGCGTCG		
TZRAC	GTTGCTCCAGGCCGCGGCACTGTT	TZRBC	TGTGCACCTCCTTCCCATTCA

Der PCR Ansatz für die Bestimmung einer einzelnen TZR Vα- bzw. TZR Vβ-Familie ist in Tab. 10 dargestellt.

Tabelle 10: Pippetiertschema für eine RT-PCR (20 µl Endvolumen)

Reagenz	*Menge*	
Familienspezifischer 5´-Primer (1,25 µM, Interactiva, Ulm, Deutschland)	3 µl	
10x PCR-Puffer I mit 15 mM $MgCL_2$ (Perkin Elmer)	2 µl	Mastermix
dNTP-Mix (2mM, Amersham Pharmacia, USA)	2 µl	
Fluoreszenzmarkierter (FAM, TET, Interactiva) 3`Primer (TZR-AC bzw. -BC,10 µM, Interactiva)	0,2 µl	
Exogener Standard [105]	0,2-0,5 µl	
AmpliTaq DNA-Polymerase (50 U/µl, Perkin Elmer)	0,15 µl	
H_2O	auf 20 µl auffüllen	
cDNA	0,1-0,2 µl	

Beim Ansatz der PCR wurden zunächst die familienspezifischen 5´-Primer à 3 µl in die PCR-Tubes (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) vorgelegt, bevor anschließend jeweils 27 µl des Master-Mixes (Tab. 10) dazupipettiert wurden. Das Gesamtvolumen des anzusetzenden Master-Mixes ergab sich aus der Anzahl der zu testenden TZR-Familien (29 TZR AV- und 26 TZR BV- Amplifikationen). Die PCR wurde, abhängig von der Annealing-Temperatur der verwendeten TZR AV- bzw. TZR BV-Primer, nach einem definierten Schema in einem Thermocycler (GeneAmp Pcr System 9 600/2 400, Perkin Elmer) durchgeführt (Abb. 5).

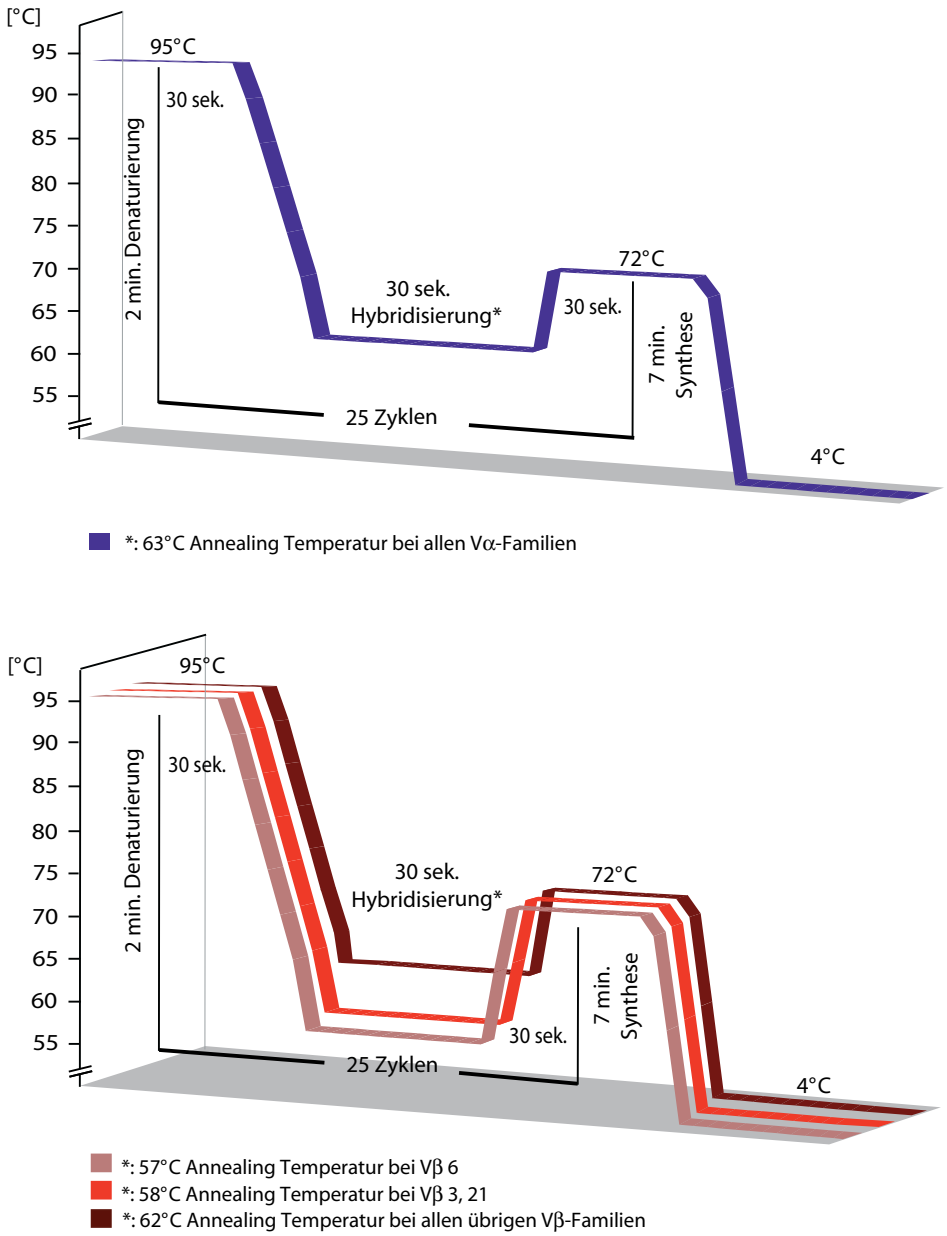


Abbildung 5: Temperaturprofil einer RT-PCR zur Bestimmung von verschiedenen T-Zell-Rezeptor (TZR)-Familien. a) Annealing-Temperaturen der spezifischen TZRAV Primer b) Annealing-Temperaturen der spezifischen TZRBV Primer.

Acrylamid-Gel für Fragmentlängen- bzw. Sequenzierungsanalyse

Für die Fragmentanalyse der PCR-Produkte wurde ein hochauflösendes denaturierendes 6%-iges Polyacrylamid-Gel gegossen. Dazu wurden 30 g Harnstoff (Gibco BRL, Paisley Scotland) in 9 ml 40%-iger Acrylamidlösung (Bio-Rad), 6 ml 10 x TBE-Puffer (siehe Anhang) und 23,5 ml Aqua ad iniectabilia (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) gelöst, steril filtriert und entgast. Anschließend wurden 15 µl TEMED (Bio-RAD, Hercules, Californien, USA) und 350 µl 10%-ige APS-Lösung (siehe Anhang) dazugegeben. Das Gel war nach sofortigem Gießen in die vorbereitete Kammer innerhalb

von zwei Stunden auspolymerisiert und konnte mit den Proben beladen werden. Die Laufbedingungen: 14 Stunden bei 30 Watt in 1 x TBE-Puffer.

Elektrophoretische Fragmentanalyse

Für die elektrophoretische Fragmentanalyse wurden 2 µl PCR-Produkt aus der familienspezifischen RT-PCR mit 2 µl „Loading buffer" (siehe Anhang) und 0,2 µl GeneScan™-500 TAMRA™ Längenstandard (Applied Biosystems, Warrington, England) versetzt und auf das oben beschriebene Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proben wurden durch den FAM- oder TET-gekoppelten 3´-Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dadurch konnte das Laserlicht des Sequenzierers (ABI 373A Sequencer, Applied Biosystems) eine Fluoreszenz der Proben induzieren, die dann entsprechend analysiert werden konnten. Das Gel fasste 36 verschiedene Proben und analysierte in einer Geschwindigkeit von 50 bp pro Stunde. Bei der Fragmentanalyse bestand die Möglichkeit, zwei verschiedene T-Zell-Rezeptor-Repertoire auf einem Gel zu analysieren. Dazu wurden die 3´-Primer der konstanten Region (TZR AC, TZR BC) bei der RT-PCR entweder mit einem grün- (TET, Interactiva, Ulm, Deutschland) oder blau- (FAM, Interactiva) markierten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Trägt man die Proben im Abstand von ca. 40 min auf das Gel auf, erhält man zwei auswertbare T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Analysen pro Geltasche.

Reamplifikation der Fragmente durch „Nested" PCR

Da die erhaltenen Fragmente eine Mischung verschiedener Amplifikate darstellen können, wurden die PCR-Produkte nicht direkt sequenziert. Aus diesem Grund behilft man sich mit der indirekten Sequenzierung, bei der zunächst Klone generiert werden müssen, die nur einen TZR mit einer bestimmten CDR3 (Complementary determining Region) Region tragen. Für eine weitere Verarbeitung müssen die PCR-Produkte erneut amplifiziert werden. Da sich bei einer weiteren PCR der Templates die Menge an Fehlhybridisierungen vergrößern würde, wurde bei der Reamplifikation der PCR-Produkte anstatt des vorherigen TZR AC- bzw. TZR BC Primers ein sogenannter „nested" Primer (Cα-np, Cβ-np, Tab. 11) eingesetzt.

Tabelle 11: Name und Sequenz der bei der Reamplifikation verwendeten „nested" Primer der konstanten Region. np = nested Primer; A = Adenosin; T = Thymidin; G = Guanosin; C = Cytidin.

	Primer Sequenz 5´-3´		*Primer Sequenz 5´-3´*
Cα-np	TTGAGAATCAAAATCGGTGAATAG	Cβ-np	ATCTCTGCTTCTGATGGCTCA

Dieser liegt etwas weiter in 5´-Richtung vom TZR AC-bzw. TZR BC-Primer und bewirkt, dass die falschen Amplifikate der ersten PCR ausselektiert werden. Für die „nested“ PCR werden pro Template 100 µl Ansätze (Tab.12) hergestellt. Die PCR durchläuft 10-25 Zyklen nach oben beschriebenem Temperaturprofil.

Tabelle 12: Pippetiertschema für eine Reamplifikation (100 µl Endvolumen).

Reagenz	*Menge*	
Familienspezifischer 5´-Primer (10 µM, Interactiva)	2,5 µl	
10x PCR-Puffer I mit 15 mM $MgCL_2$ (Perkin Elmer, Weiterstadt)	10 µl	Mastermix
dNTP-Mix (2 mM, Amersham Pharmacia, USA)	10 µl	
3´Primer Cα-np bzw. Cβ-np (10 µM, Interactiva)	2,5 µl	
AmpliTaq DNA-Polymerase (50 U/µl, Perkin Elmer)	2 µl	
H_2O	72 µl	
Template	1 µl	

Aufreinigung der PCR Produkte

Die Aufreinigung erfolgte über eine Agarose-Gel-Elektrophorese und Anfärben mit Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Es wurde eine „low-melting-point“ Agarose (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) mit niedrigem Schmelzpunkt verwendet. 1,5 mg dieser Agarose wurden mit 100 ml TAE-Puffer (siehe Anhang) versetzt, aufgekocht und unter Rühren und Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (Sigma) etwas abgekühlt, bevor das noch flüssige 1,5 %-ige Gel in eine Elektrophorese-Kammer gegossen wurde. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden die aus der Reamplifikation erhaltenen PCR-Produkte mit 20 µl „Loading buffer“ (siehe Anhang) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach ca. einer Stunde Lauf bei 80-100 Watt konnten die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Verschleppung der DNA zwischen den Banden erfolgte. Das Gel wurde in einem autoklavierten 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) bei +4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Die eigentliche Aufreinigung erfolgte mittels des DNA Purification Kits *Easy Pure*® (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers. Das Gel wurde zunächst durch Zugabe einer Salzlösung (*SALT*, Biozym) bei +55 °C gelöst. Anschließend wurde das *BIND*-Reagenz (Biozym) hinzugefügt,

welches eine größendefinierte Silicamatrix darstellt, die sowohl einsträngige als auch doppelsträngige DNA bindet, während DNA-Fragmente, die kleiner als 40 bp sind, nicht gebunden werden. Nach Inkubations-, Zentrifugierungs-, Waschschritten und Trocknen des DNA-Pellets in einer Speed-Vac (Bachhofer, Reutlingen, Deutschland) wurde die DNA in 30 µl sterilem Wasser gelöst. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt.

Ligation

Die aufgereinigte DNA wurde in ein pGEM®-T Vektor-System (Promega, Madison, USA, Abb. 6) kloniert. Diese Plasmid-Vektoren besitzen an beiden Enden einen 5´-Thymidin Ein-Basen-Überhang (Abb. 6).

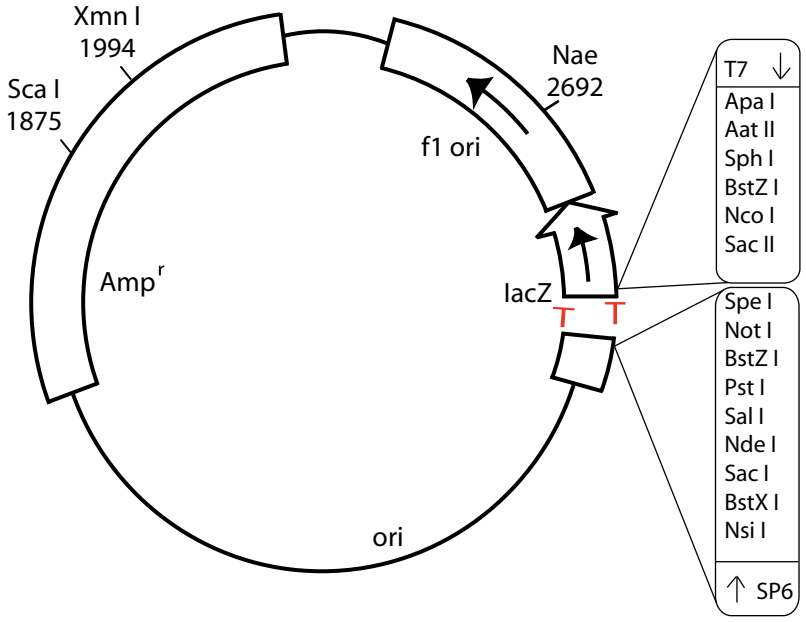


Abbildung 6: Aufbau des pGEM®-T Vektors. lacZ = lacZ-Promotor, T7= T7 RNA Polymerase Promotor, Sp6= Sp6 Polymerase Promotor, Ori = bakterieller Replikationsstart, T = Thymidin-Einbasen-Überhang.

Diese Eigenschaft erleichtert die Ligation der PCR-Produkte, da die meisten Polymerasen einen 3´-Adenin-Überhang produzieren. Dadurch, dass der pGEM®-T Vektor ein lacZ´-Gen besitzt, ist eine anschließende Blau-Weiß-Selektion, die auf einer Unterbrechung des lacZ´-Gens beruht, möglich. Als Positivkontrolle wurde eine Ligation mit einem vom Hersteller mitgelieferten Kontroll-Insert durchgeführt. Die Menge an

PCR-Produkt, die pro Ansatz ligiert wurde, betrug 30-50 ng. Der Ligationsansatz (Tab. 13) wurde über Nacht bei ca.+12 °C inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 13: Pippetiertschema für eine Ligation (10 µl Endvolumen).

Reagenz	*Menge*	
T4 DNA-Ligase 2x Puffer (Promega)	5 µl	Mastermix
pGEM-T Vektor (50 ng/ml, Promega)	1 µl	
T4 DNA-Ligase (3 U/µL, Promega)	1 µl	
PCR-Produkt	3 µl	

Transformation

Für die Transformation wurden LB-Ampicillin-Agarplatten hergestellt. Nachdem die in Tab. 14 dargestellten Bestandteile zusammengemischt waren, wurde die Mischung autoklaviert und anschließend unter Rühren etwas abgekühlt. Nach Zugabe von Ampizillin (100 µg/ml Endkonzentration, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurden die Platten (Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegossen.

Tabelle 14: Rezeptur für 40 LB-Ampicillin-Agarplatten.

Reagenz	*Menge*
NaCl (Baker, Deventer, Holland)	10 g
Trypton (Difco)	10 g
Hefe-Extrakt (Difco)	5 g
Agar (Difco)	20 g
H_2O bidest	1 L

Bei der Transformation wurden die ligierten Plasmide in kompetente Bakterien (Epicurian Coli® XL10-Gold® Kan ultracompetent cells, Stratagene, LA Jolla, USA) eingeschleust. Pro Ligation wurden 20 µl der Bakterien auf Eis in 14 ml PP-Rundboden-Fal-

con-Röhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Le Pond De Claix, Frankreich) pipettiert und mit jeweils 0,8 µl β-Mercaptoethanol (XL10-Gold® β-mercaptoethanol mix, Stratagene) versetzt. Nach Zugabe von jeweils 2,5 µl der Ligations-Ansätze und einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation, in dem man die Bakterien einem 30 Sekunden andauernden „Hitzeschock" (+42 °C) unterzog. Dadurch wurde die Membran der Bakterien für die Plasmide durchlässig. Anschließend wurden die transformierten Bakterien in 225 µl SOC-Medium (siehe Anhang) aufgenommen und eine Stunde im Schüttelinkubator bei +37 °C kultiviert. Als Positivkontrolle für die Transformation wurde ein Ansatz mit dem Plasmid (pUC18) durchgeführt. In der Zwischenzeit wurden die Agar-Platten mit 10 µl IPTG (100 mM, Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 30 µl SOC-Medium und 50 µl 2%-igem X-Gal (Sigma) beschichtet. Als letztes wurden jeweils zwei Platten pro Ansatz mit 30 µl bzw. 100 µl der Transformationsreaktionen bestrichen. Die Inkubation der Bakterien erfolgte für 14-16 h im Bakterien-Brutschrank.
Nach dieser Inkubation zeigte sich eine Blau- oder Weiß-Färbung der gewachsenen Bakterienkolonien. Die weißen Kolonien waren positiv transformiert, da durch das ligierte Insert das LacZ´-Gen der Vektoren unterbrochen wurde und folglich keine Verstoffwechselung des Lactose-Analogons X-Gal mehr stattfinden konnte. Im anderen Falle (transformierte Plasmide, die kein Insert tragen) wurde das blaue Reaktionsprodukt sichtbar.

Über-Nacht-Kultivierung der Transformanten

Von jeder eingesetzten Probe wurden acht der erhaltenen weißen Kolonien mit einer sterilen ungestopften 10 µl Pipettenspitze von der Agar-Platte entnommen und zusammen mit der Pipettenspitze in 3 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) LB-Medium überführt. Danach erfolgte eine Über-Nacht-Kultivierung bei +37 °C im Schüttelinkubator.

Extraktion der Plasmid DNA aus den Bakterien

Bei der Extraktion der DNA kam der QIAprep 8 MiniPrep® Kit (Qiagen GmbH., Hilden, Deutschland) zum Einsatz. Dabei wurden zunächst die über Nacht angewachsenen Bakterien abzentrifugiert und von dem LB-Medium getrennt. Anschließend erfolgte die Lyse der Bakterien und die Ausfällung der Zellbestandteile durch Zugabe von den vom Hersteller mitgeschickten Puffern. Anschließend wurde die erhaltene DNA über eine Silikatmembran-tragende Säule (Qiagen) bei hoher Salzkonzentration

gebunden und in einem vakuumerzeugenden System (Qiavac® 6s manifold, Quiagen) durch mehrere Waschschritte aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 x 60 µl Wasser von der Säule eluiert. Für die Konzentrationsbestimmung, die mittels Messung der optische Dichte (OD: A260/A280) erfolgte, wurde das Volumen (120 µl) in einer Speed-Vac auf ca. 30 µl verringert. Die DNA konnte dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren werden.

Sequenzierungs-PCR zur Aufbereitung der Plasmid-DNA

Bei der Sequenzierungs-PCR kam der *ABI PRISM*™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) zum Einsatz. Dieser ist speziell auf den ABI 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Warrington, USA) eingestellt und beinhaltet einen Terminator Premix, bestehend aus vier Dye-Terminatoren, vier Nukleotiden, Tris-HCl-Puffer, $MgCl_2$, einer thermostabilen sauren Phosphatase und der AmpliTaq DNA Polymerase FS. Als Primer wurde ein T7-Primer (Interactiva, Ulm, Deutschland) verwendet, da der für die Ligation verwendete Vektor einen T7-Promotor besitzt (Abb. 6). Die Bestandteile wurden, wie in Tab. 15 dargestellt, gemischt und nach dem Temperaturprofil in Abb. 7 amplifiziert.

Tabelle 15: Pippetiertschema für eine Sequenzierungs-PCR (10 µl Endvolumen)

Reagenz	*Menge*	
Premix (Perkin Elmer)	4 µl	Mastermix
H_2O	3 µl	
T7-Primer (10 µM)	1 µl	
DNA	2 µl	

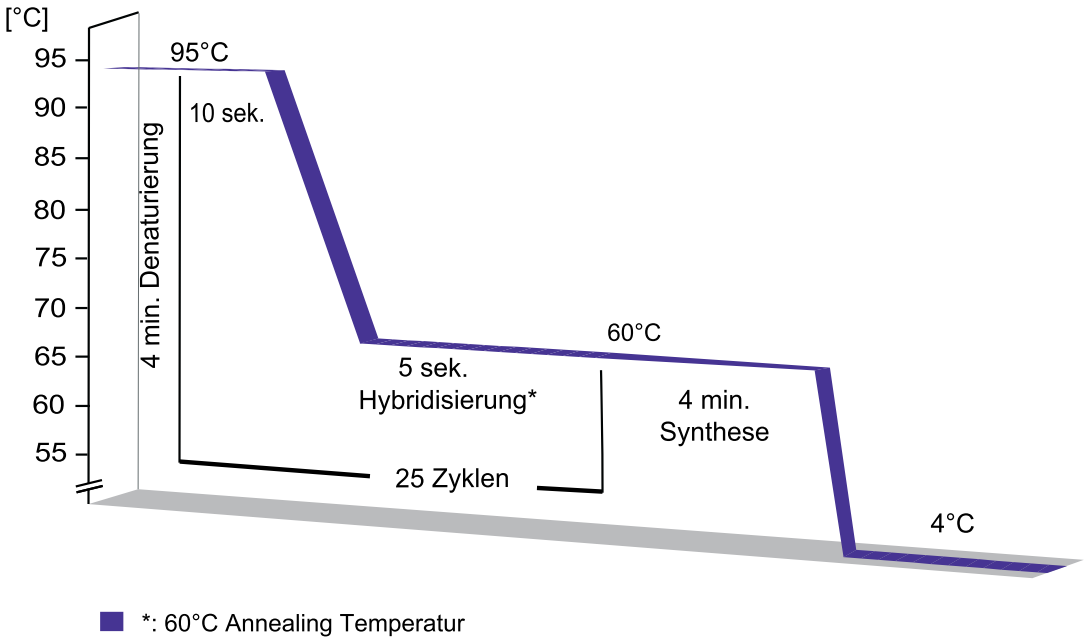


Abbildung 7: Temperaturprofil einer PCR zur Sequenzierung bestimmter DNA-Abschnitte.

Elektrophoretische Analyse der Sequenzen

Für die Sequenzierung bedurfte es noch eines Aufreinigungsschrittes der PCR-Produkte, um störende Dye-Terminatoren und Salze zu entfernen. Die PCR-Produkte (gesamte 10 µl) wurden in 1 µl 3M Natrium-Acetat Lösung (pH 4,6, Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und mit 29 µl 100%-igem Ethanol versetzt (Fällung). Nach 5 min Inkubation bei RT und einer 20-minütigen Zentrifugation bei 14 000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in der Speed-Vac vollständig getrocknet. Nach Zugabe von 4 µl „Loading buffer“ (siehe Anhang) wurden die Proben für zwei Minuten bei 90 °C denaturiert. Nach Abkühlen erfolgte der Auftrag und Lauf der Proben auf dem oben beschriebenen hochauflösenden, denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Die Sequenzen wurden durch den ABI 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Warrington, USA) ermittelt und anschließend mit Hilfe der Factura™- und Sequence Navigator™-Software analysiert. Die vollständige Charakterisierung des auf der T-Zell-Linie exprimierten T-Zell-Rezeptors mit allen Segmenten und der hypervariablen CDR3-Region (C-J-NDN-V) erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Sequenz mit Sequenzen der verschiedenen Segmente, die aus der Germeline erhalten wurden, und Umschreiben der Nukleosid-Sequenz in die Aminosäure-Sequenz.

Durch den verwendeten Primer wurde die Zugehörigkeit zu den jeweiligen V-Familien (Vα bzw. Vβ) überprüft. Dabei kann es zu einem V-nibbling – einem spezifischen, durch die terminale Desoxyribunukleotidyl-Transferase bewirkten Verlust von Nukleotiden am 3′-Ende der V-Region – kommen. Dieses V-nibbling wurde anhand der Sequenzen, die von *Arden* beschrieben wurde [8], ermittelt. Von dieser Transferase wird auch das hypervariable N-D-N-Fragment eingefügt. Die J-Familie ist mit der V-Familie frei kombinierbar. Dabei können am 5′-Ende ebenfalls Nukleotide fehlen (J-nibbling). Die Zugehörigkeit der ermittelten Sequenz zu den publizierten J-Gensegmenten erfolgte über die im Internet veröffentlichten Sequenzen auf der Homepage von IMGT (http://imgt.cines.fr). Die erhaltene Sequenz wurde dann noch in eine Aminosäuresequenz umgeschrieben.
Für die Definition der CDR3 Region wurden die Kriterien nach *Moss* und *Mugnaini* [114, 115, 118] verwendet. Demnach beginnt die CDR3-Region mit derjenigen Aminosäure im 3′-terminalen Ende der V-Familie, die auf das konservierte Alanin des C-A-X Aminosäuremotives folgt. Im Falle der Vβ-Familien handelt es sich bei X meist um zwei Serin Reste (C-A-S-S) [114, 115]. Die Aminosäure, die die CDR3 Region abschließt, befindet sich vor dem konservierten F-G-X-G-T Aminosäuremotiv der beginnenden 5′-gelegenen J-Region.

2.3.7 Selektion von Vβ-positiven Zellen

Der Nachweis der Co-Expression der ermittelten TZR-Vα- bzw. TZR-Vβ-Familien der T-Zell-Linien erfolgte indirekt durch Zell-Sortierung (Durchführung siehe Kapitel 2.2.2). Von den erhaltenen TZR-Vβ positiven Zellen wurde anschließend die RNA wie oben beschrieben (Kapitel 2.3.6) isoliert und eine Fragmentanalyse für alle TZR-Vα-Familien durchgeführt (Kapitel 2.3.6).

2.3.8 Phänotypisierung der T-Zell-Linien

Elektronenmikroskopie

Um strukturelle Charakteristika der T-Zell-Linien zu erhalten, erfolgte in Kooperation mit der elektronenmikroskopischen Abteilung der Universität Ulm die Erstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Hierzu wurden die T-Zell-Linien, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, restimuliert. Eineinhalb Stunden nach Zusammenführen der T-Zellen und der APC wurden die Zellen in einer Fixierungslösung fixiert. Ein Teil der so fixierten Zellen wurde auf einem Objektträger aufgetragen und für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen präpariert. Die verbliebenen Zellen wurden zunächst zentrifugiert, bevor aus dem Pellet 70 nm dicke Schnitte präpariert wurden.

Phänotypisierung der T-Zell-Linien mittels Durchflusszytometrie

Die Phänotypisierung der T-Zell-Linien erfolgte mittels Färbung mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen T-Zell-Oberflächen-Moleküle und anschließender Analyse im Durchflusszytometer. Dazu wurden zunächst 0,2 Mio. Zellen in einer Vierfach-Färbung mit jeweils 5 µl der zu untersuchenden Oberflächenmarker und 100 µl FACS-Puffer I (siehe Anhang) versetzt (siehe Kapitel 2.4.2). Nach einer Inkubation von 20 Minuten wurden die Zellen mit PBS (siehe Anhang) gewaschen, anschließend in Cell-Fix-Lösung (Becton Dickinson) aufgenommen und im FACS-Gerät analysiert. Die Zellen wurden durch Färbung mit verschiedenen Oberflächenmarkern nach obigem Protokoll phänotypisiert. Hierzu kamen die Reaktionsansätze 1-8 (Tab. 16) zur Verwendung.

Tabelle 16: Antikörpermischung zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenmarkern. FITC, PE, PerCP, APC = verschiedenfarbig fluoreszierende Konjugate

Ansatz	*FITC*	*PE*	*PerCP*	*APC*
1	CD45RA	CD45RO	CD3	CD8
2	CD4	CD80	CD3	-
3	-	CD4	CD3	CD86
4	CD4	CD154	CD3	-
5	CLA	CD95	CD4	-
6	CD69	CD4	CD3	-
7	CD134	CD4	CD3	CD25
8	CD8	CD38	CD3	HLA-DR

2.4 Populationsstudie

2.4.1 Einfluss von co-stimulatorischen Molekülen

Um den Einfluss der Co-Stimulation zu betrachten, wurde eine FACS-Analyse wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden jeweils in zwei zusätzlichen Ansätzten anti-CD28 Antikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Verglichen wurde dabei sowohl eine Auswirkung der CD28 Co-Stimulation auf die Negativkontrolle, als auch auf die Positivkontrolle mit Tetanus Toxoid.

2.4.2 Durchflusszytometrie

Bei der Populationsstudie wurden frische oder aufgetaute PBMC von T1D-Patienten, T2D-Patienten, Ak+ Probanden und gesunden Kontrollpersonen in einer Konzentration von 0,4 Mio. Zellen pro 150 µl Kulturmedium auf einer 96 Well Flachbodenplatte (Falcon, Le Pond De Claix, Frankreich) verteilt. Die Ansätze wurden über Nacht im Brutschrank (+37 °C, 6% CO_2) inkubiert, um eine Reifung der professionellen APC zu ermöglichen, die durch Adhärenz der dendritischen Zellen gekennzeichnet ist. Nach dieser Vorinkubation wurden die Zellen in Doppelwerten mit den Antigenen Proinsulin, Insulin, Insulin-B-Kette bzw. den Peptiden p1-21 (siehe Kapitel 2.1.9) in einer Konzentration von 10 µg/ml versetzt. Bei einer zu geringen Menge an zur Verfügung stehenden PBMC konnten nur Einzelwerte bestimmt werden. Als Positivkontrolle diente Tetanus Toxoid (Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark), als Negativkontrolle die „Stimulation" mit Kulturmedium und als Qualitätskontrolle die Stimulation mit einem Kontrollpeptid (siehe Kapitel 2.1.9) Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden zunächst die Zell-Kultur-Überstände abgenommen. Anschließend wurden die Wells dreimal mit 200 µl Kulturmedium aufgefüllt, vollständig abgeerntet und in FACS-Röhrchen (Falcon, Le Pond De Claix, Frankreich) überführt. Nach einem Zentrifugierungsschritt (10 min bei 1 200 rpm) erfolgte die Vierfach-Färbung mit jeweils 100 µl fluoreszenzmarkierter Antikörper-Lösung (Tab. 17) gegen die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle.

Tabelle 17 : Antikörpermischung zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenmarkern bei der Populationsstudie. FITC, PE, PerCP, APC = verschiedenfarbig fluoreszierende Konjugate

Reagenz	*Menge*
CD134 FITC (Pharmingen)	1,5 µl
CD45RA RD1 (PE) (Beckman Coulter)	1,5 µl
CD3 PerCP (Becton Dickinson)	1,5 µl
CD25 APC (Pharmingen)	1,5 µl
PBS + 0,5% BSA	100 µl

Nach einer Inkubation von 20 min bei +4 °C wurden die Proben mit PBS (siehe Anhang) gewaschen und anschließend zur sofortigen Messung in 5 %-iger BSA-Lösung (FACS-Puffer I) aufgenommen. Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem *FACS Calibur*™ (Becton Dickinson) und der CellQuest Software. In den Abbildungen ist jeweils der Mittelwert bzw. Einzelwert der Stimulationsindizes (SI) aufgetragen, der sich aus dem Verhältnis aus der Expression (in %) „mit Antigen" zu „ohne Antigen" zusammensetzt. Als positive Expression wurde ein SI ≥ 3 festgelegt. Dabei wurde der Quadrant der Negativkontrolle so gelegt, dass 0,1 % der $CD45RO^+$-Zellen für Ox40 bzw. CD25 positiv waren (siehe auch Kapitel 3.2.3).
Bei jeder Analyse wurden aufgrund der möglichen Autofluoreszenz und von unspezifischen Bindungen der Antikörper über Fc-Rezeptoren zusätzlich Kontrollfärbungen durchgeführt. Dabei wurden PBMC der jeweiligen Probanden nach oben beschriebenem Färbeprotokoll mit isotypischen Immunglobulinen (IgG) inkubiert. Der dazu verwendete Antikörpermix bestand aus jeweils 5 µl IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PerCP, IgG2a-APC und 100 µl 5 % BSA-Lösung.

2.5. Statistik

In die statistische Auswertung gingen jeweils die Mittelwerte der Einzelmessungen ein. Sowohl in der statistischen Analyse des Vergleiches der Ox 40 bzw. CD 25 Expression als auch im Vergleich des Alters zwischen den untersuchten Gruppen wurde der Mann-Whitney U-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms StatView® Version 5.0 (SAS Institute Inc, USA). Das Signifikanzniveau lag bei allen Tests bei 5 % ($\alpha = 0{,}05$).
Die in der graphischen Darstellung verwendeten Box-and-Whiskers-Plots zeigen neben dem 25 % und 75 % Quantil auch den Median. Die Whiskers stellen das 10 % bzw. 90 % Quantil dar.

3 Ergebnisse

3.1 T-Zell-Linien

3.1.1 Patientendaten

Von einem männlichen T1D-Patienten wurden unmittelbar nach Diabetesmanifestation mittels der Splitt-Well Methode T-Zell-Linien generiert. In Tab. 18 sind die demographischen Daten dieses Patienten zusammengefasst.

Tabelle 18: Demographische Daten des untersuchten T1D-Patienten. Cut-off Werte der Antikörpertiter: GADA 3,9 KU/L; IA-2A 1,85 KU/L; IAA 281,48 µU/L; ICA 20 JDFU. GADA = Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase; IA-2A = Antikörper gegen Tyrosinphosphatase; IAA = Antikörper gegen Insulin; ICA = Antikörper gegen Inselzellgewebe

Alter	*HLA-Klasse-II-Allele*			*HLA-Klasse-I-Allele*		*Antikörperstatus*			
	DRB1	*DQB1*	*DRB4*	*A*	*B*	*GADA*	*IA-2A*	*IAA*	*ICA*
[Jahre]						*[KU/l]*	*[KU/l]*	*[µU/l]*	*[JDFU]*
27	*0401,0401	*0301,0302	*01xx	*02,26	*0801,4402	33,65	95,49	6113,32	160

3.1.2 Zytokinmuster verschiedener Zell-Populationen

Um den Zytokinstatus des Probanden *ex vivo* zu charakterisieren, wurden drei verschiedene Zellpopulationen (PBMC, $CD4^+CD45RA^+$ und $CD4^+CD45RA^-$) im Kurzzeit-Test mit Proinsulin (PI), Insulin (I), Insulin A- und B-Kette und 21 überlappende Peptiden stimuliert (siehe Kapitel 2.2.3). Dabei zeigte sich in allen untersuchten Populationen nach Messung der Zytokine im Überstand eine klare Dominanz des inflammatorischen Zytokins IFNγ (Abb. 8).

Die PBMC wiesen ein breites Epitop-Erkennungsmuster auf (Abb. 8a). Eine IFNγ Sekretion wurde bei den selektierten CD4-Populationen nur von wenigen Epitopen induziert. CD45RO-Memory Zellen erkannten Epitope der PPI-Signalsequenz (Peptid p3 und p4) und der Insulin A-Kette (Peptid p19 und p20) (Abb. 8c). Die $CD45RA^+$-naiv/regulatorischen Zellen reagierten ebenfalls gegen ein Epitop der Insulin A-Kette (Peptid p20), vor allem aber gegen Peptide der Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und Insulin A-Kette (Peptid p17 und p18) (Abb. 8b). Eine IFNγ Sekretion gegen die gesamten Antigene Proinsulin, Insulin, A-Kette und B-Kette war kaum nachzuweisen.

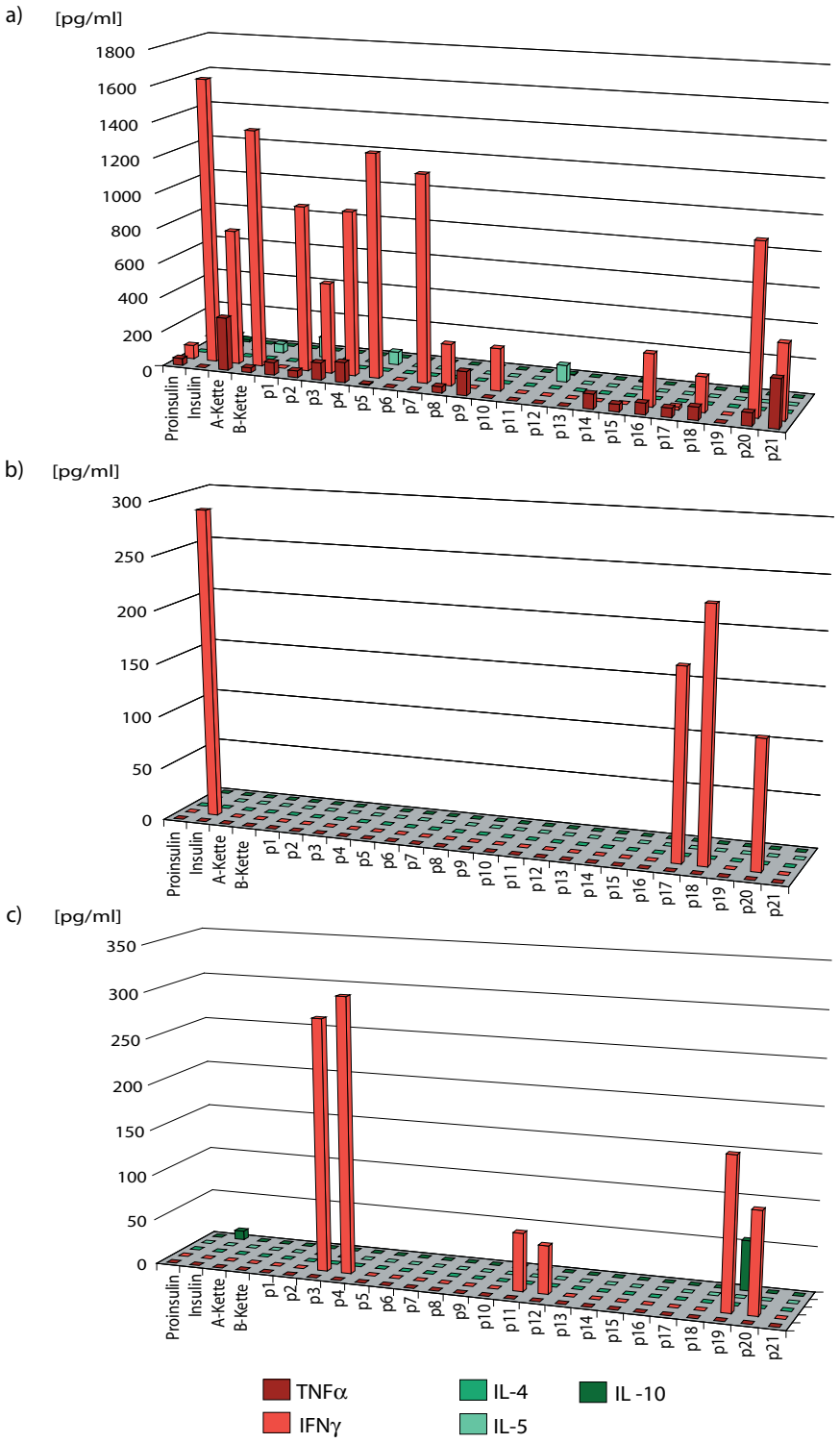


Abbildung 8: Zytokinmuster verschiedener Subpopulationen. a) periphere Blutlymphozyten (PBMC), b) $CD4^+CD45RA^+$ naiv/regulatorische, c) $CD4^+CD45RO^+$ Memory T-Zellen T-Zellen. Dargestellt ist die Zunahme an sezernierten Zytokinen in pg/ml. TNF = Tumornekrosefaktor; IFN = Interferon; IL = Interleukin; p = Peptid.

3.1.3 Etablierungen spezifischer T-Zell-Linien

Für die Generierung von Langzeit T-Zell-Linien wurde die Splitt-Well Methode angewendet. Hierzu wurden jeweils mehrere CD4-Microkulturen ausgesät, die mit den Antigenen PI und I sowie den Peptiden p3, p4, p17, p18, p20 und p21 stimuliert wurden, getroffen. Nach drei Restimulationsperioden konnten von zwei Zell-Linien, die mit p21 (A5-21; SD32.5) bzw. p17 (C18-A1; SD52) stimuliert wurden, die in Abb. 9 dargestellten Muster gewonnen werden. Abbildung 9 zeigt das Zytokinmuster bzw. die dazugehörigen Proliferationsdaten der generierten Linien SD32.5 und SD52.

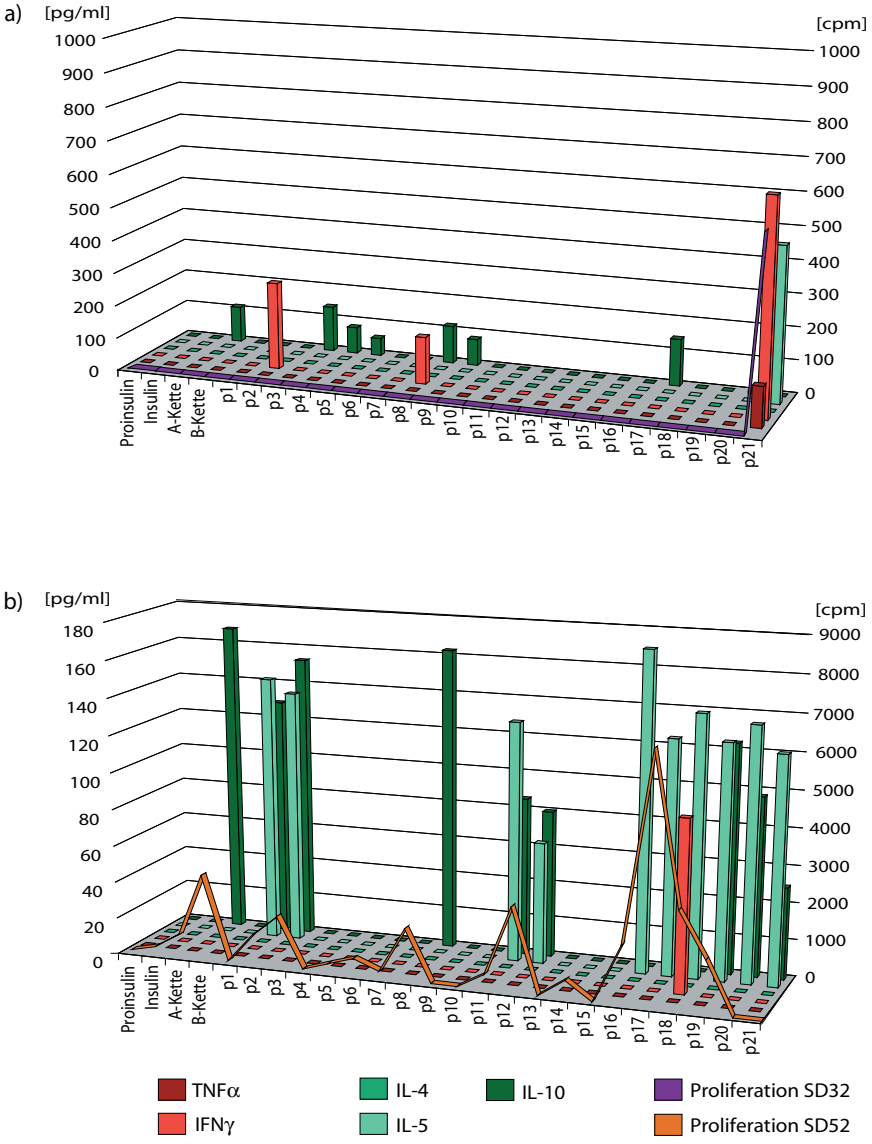


Abbildung 9: T-Zell-Linien gegen a) Peptid A5-21 (SD32.5), b) Peptid C18-A1 (SD52). Dargestellt ist das sezernierte Zytokinprofil (Balken) in pg/ml und das Proliferationsergebnis in „counts per minute" (cpm; Linie) jeweils nach abgezogener Negativkontrolle. TNF = Tumornekrosefaktor; IFN = Interferon; IL = Interleukin; p = Peptid.

Linie SD32.5 präsentierte sich aufgrund ihrer hohen IFNγ Sekretion (hellrot) und der Proliferation (lila Linie), die nur nach Stimulation mit Peptid A5-21 (p21) induziert wurde, als homogene Zellpopulation. Bei Linie SD52 kam es zu einer dominanten Proliferation gegen Peptid C18-A1 (orange Linie). Allerdings wurde diese Linie auch durch andere Peptide zur Proliferation angeregt, was auf eine sehr heterogene Zellpopulation hindeutete. Das Zytokinprofil war hierbei durch eine ausgeprägte IL-5 Sekretion (hellgrün) gekennzeichnet. Eine IFNγ Sekretion konnte in gerninger Menge nur nach Stimulation mit Peptid p18 detektiert werden.

3.1.4 Nachweis der Spezifität

Dosis-Wirkungs-Analysen der Linie SD32.5

Es hat sich gezeigt, dass Linie SD32.5 nach weiteren Restimulationszyklen mit Peptid p21 (A5-21) spezifisch für dieses Peptid war. Aus der in Abb. 10 dargestellten Dosis-Wirkungskurve geht hervor, dass, wie für eine spezifische Linie zu erwarten, mit steigender Peptid-Konzentration eine erhöhte T-Zell-Reaktivität erzielt wurde.

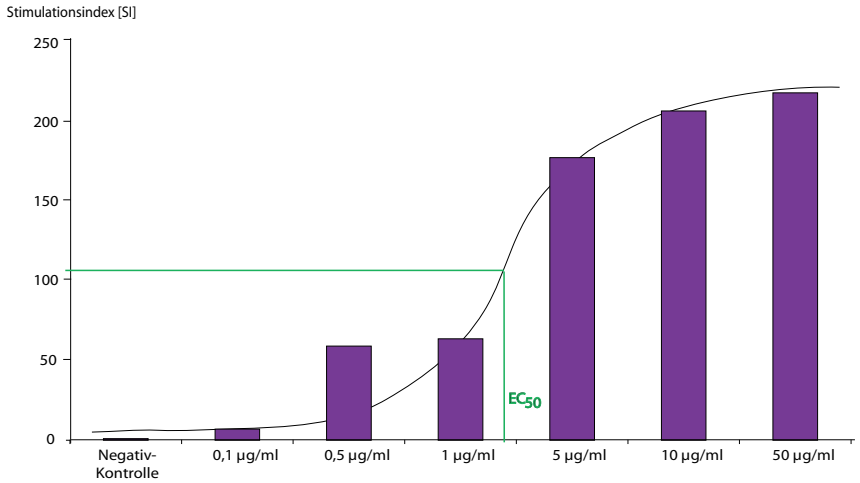


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurve der Linie SD32.5. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Triplikaten eines Proliferations-Assays bei verschiedenen Konzentrationen von Peptid A5-21 (p21) bestimmt wurde. Ein SI ≥ 3 wurde als positiv gewertet. Schematische Darstellung der EC50 = effektive Peptidkonzentration für halbmaximale Proliferation.

Aus dem sigmoidalen Anstieg lässt sich erkennen, dass ab einer Konzentration von 10 µg/ml eine Sättigung erreicht wurde. Die effektive Peptidkonzentration, bei der die halbmaximale Proliferation erreicht wurde (EC50), betrug ca. 2,5 µg/ml. Bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml zeigte sich bereits ein Stimulationsindex von über drei (SI = 7).

Mit steigender Konzentration stieg sowohl die Zahl an IFNγ sezernierenden Zellen als auch die Menge an sezernierten IFNγ an. Abbildung 11a zeigt eine intrazelluläre Färbung nach 24 h Inkubation mit Peptid A5-21 (p21), Abb. 11b die durch ELISA bestimmte Menge an sezernierten Zytokinen nach drei Tagen. Aus Abbildung 11a geht hervor, dass die Anzahl an IFNγ sezernierenden Zellen von 0,11 % in der Negativkontrolle auf 10,5 % nach Zugabe von 50 µg/ml Peptid A5-21 anstieg. Wobei ein Stimulationsindex von 95 erzielt wurde. Diese Ergebnisse konnten auch im ELISA bestätigt werden. Eine IL-10 Sekretion konnte weder bei der intrazellulären Färbung noch bei der IL-10 Bestimmung durch ELISA nachgewiesen werden. Nach einer Peptid-Konzentration von 50 µg/ml wurden 1% der Zellen induziert IL-4 zu sezernieren. Eine IL-4 Sekretion war im ELISA jedoch nicht nachzuweisen. Im ELISA wurde zusätzlich noch das Zytokin IL-5 bestimmt. Es konnte eine relativ starke mit steigender Konzentration an Peptid steigende IL-5 Sekretion nachgewiesen werden. Insgesamt war die Linie SD32.5 vor allem durch die dominante Sekretion der Zytokine IFNγ und IL-5 charakterisiert.

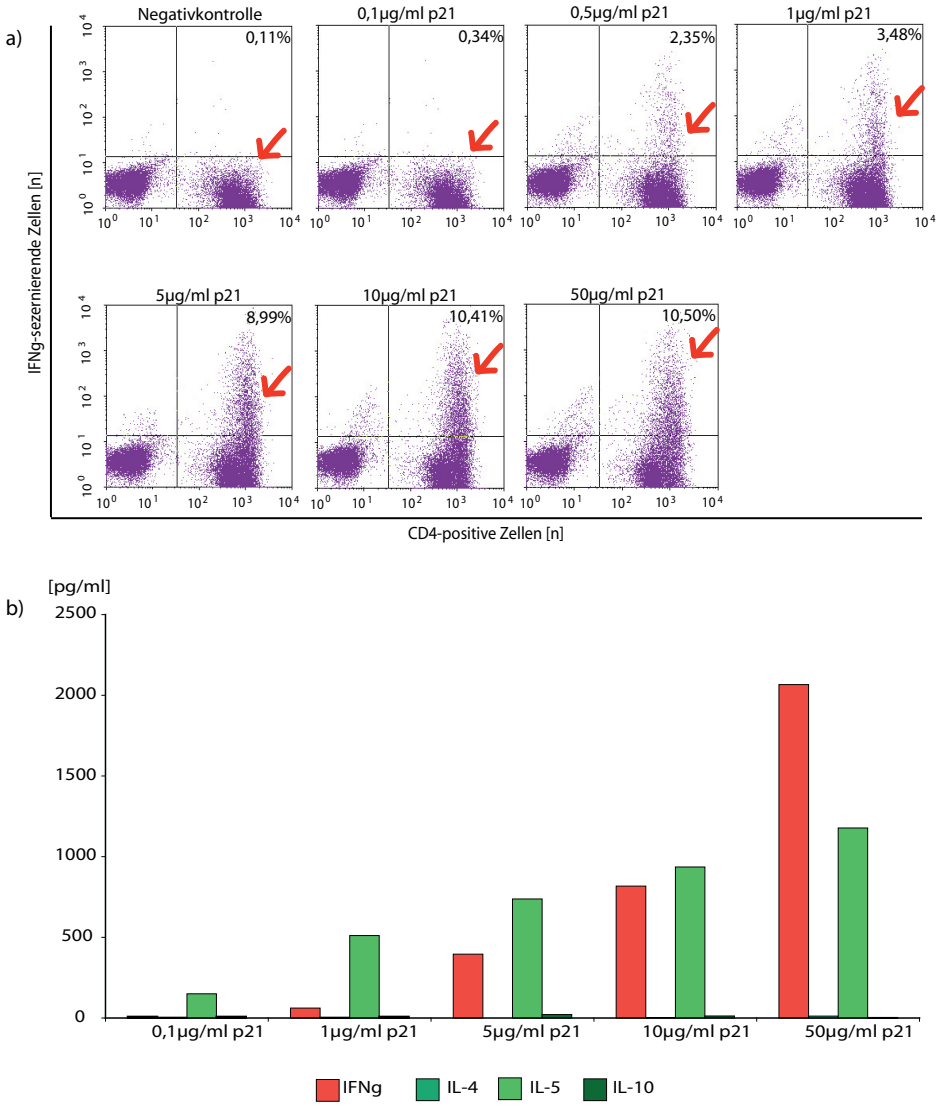


Abbildung 11: Zytokin Sekretion von SD32.5 nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid A5-21 (p21). Dargestellt ist a) die Menge an $CD4^+$ IFNγ sezernierenden Zellen, gemessen durch intrazelluläre Färbung b) die Zunahme an sezernierten Zytokinen im Zellkulturüberstand in pg/ml. TNF = Tumornekrosefaktor; IFN = Interferon; IL = Interleukin; p = Peptid.

Dosis-Wirkungs-Analysen der Linie SD52

Nach diversen Restimulationszyklen, Klonierungsversuchen und Selektionsversuchen konnte aus der heterogenen Linie SD52 die Spezifität eines Subklons SD52c1 für Peptid C18-A1 (p17) nachgewiesen werden. Aus der in Abb. 12 dargestellten Dosis-Wirkungskurve geht hervor, dass mit steigender Peptid-Konzentration eine erhöhte T-Zell-Reaktivität erzielt wurde. Aus dem sigmoidal verlaufenden Anstieg lässt sich erkennen, dass ab einer Konzentration von 10 µg/ml bereits eine Sättigung erreicht wurde. Der EC50-Wert wurde nach einer Konzentration von ca. 2,5 µg/ml erreicht. Ab einer Konzentration von 0,5 µg/ml zeigte sich ein positiver Stimulationsindex (SI = 4).

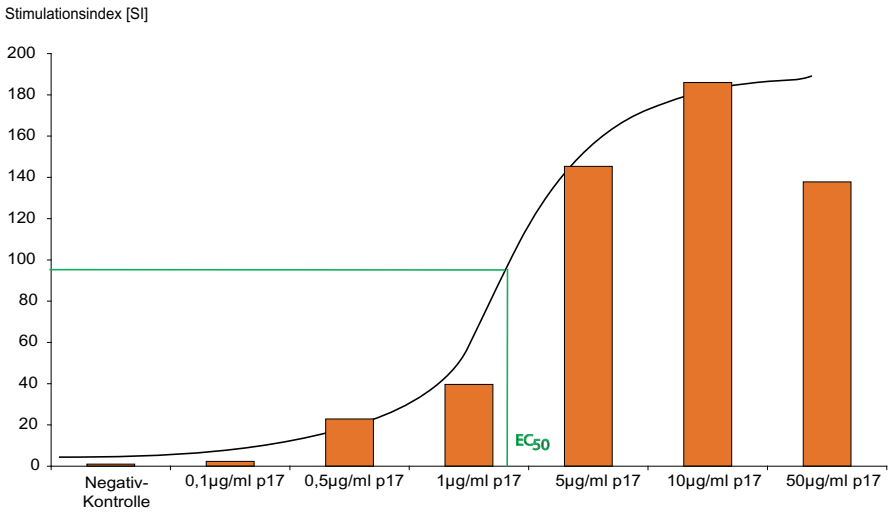


Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurve von SD52c1. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Doppelwerten eines Proliferations-Assays bei verschiedenen Konzentrationen an Peptid C18-A1 (p17) bestimmt wurde. Ein SI ≥ 3 wurde als positiv gewertet. Schematische darstellung der EC50 = effektive Peptidkonzentration für halbmaximale Proliferation.

Mit zunehmender Konzentration stieg sowohl die Zahl an IFNγ sezernierenden Zellen (ELISPOT) als auch die Menge an sezerniertem IFNγ (ELISA) an. Abbildung 13a stellteinen IFNγ ELISPOT-Assay nach 24 h Inkubation mit Peptid C18-A1 (p17) dar, wobei exemplarisch jeweils nur ein Well der analysierten Doppelwerte abgebildet wurde. Abbildung 13b zeigt die durch ELISA nach drei Tagen Stimulation im Überstand bestimmte Menge an sezernierten Zytokinen.

Aus den ELISPOT Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass mit steigender Konzentration an eingesetztem Peptid C18-A1 die Anzahl der Spots, die der Anzahl der IFNγ sezernierende Zellen entspricht, gestiegen ist. Dabei nahm die Spotzahl im Mittel von 7 bei der Negativkontrolle auf 392 bei 50 µg/ml Peptid zu. Diese Anzahl der Spots konnte auch durch die mitgetestete Mitogenzugabe (2 µg/ml PHA) nicht übertroffen werden. Die Phytohämagglutinin (PHA) Stimulation induzierte im Mittel eine Spotzahl von 368 (siehe Abb. A-1 Anhang). Proportional zur steigenden Konzentration an eingesetztem Peptid konnte auch durch den ELISA-Test im Zellkulturüberstand eine gesteigerte Menge an sezerniertem IFNγ (0-329 pg/ml) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu IFNγ konnten im ELISPOT keine IL-4 sezernierenden Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. A-2 Anhang). Im Zellkulturüberstand war durch ELISA jedoch eine geringe Menge (0-50 pg/ml) des Th2-Zytokins IL-4 nachweisbar. Und auch eine geringe Menge an IL-10 Menge konnte bei diesem Klon (SD52c1) im Überstand detektiert werden (0-116 pg/ml).

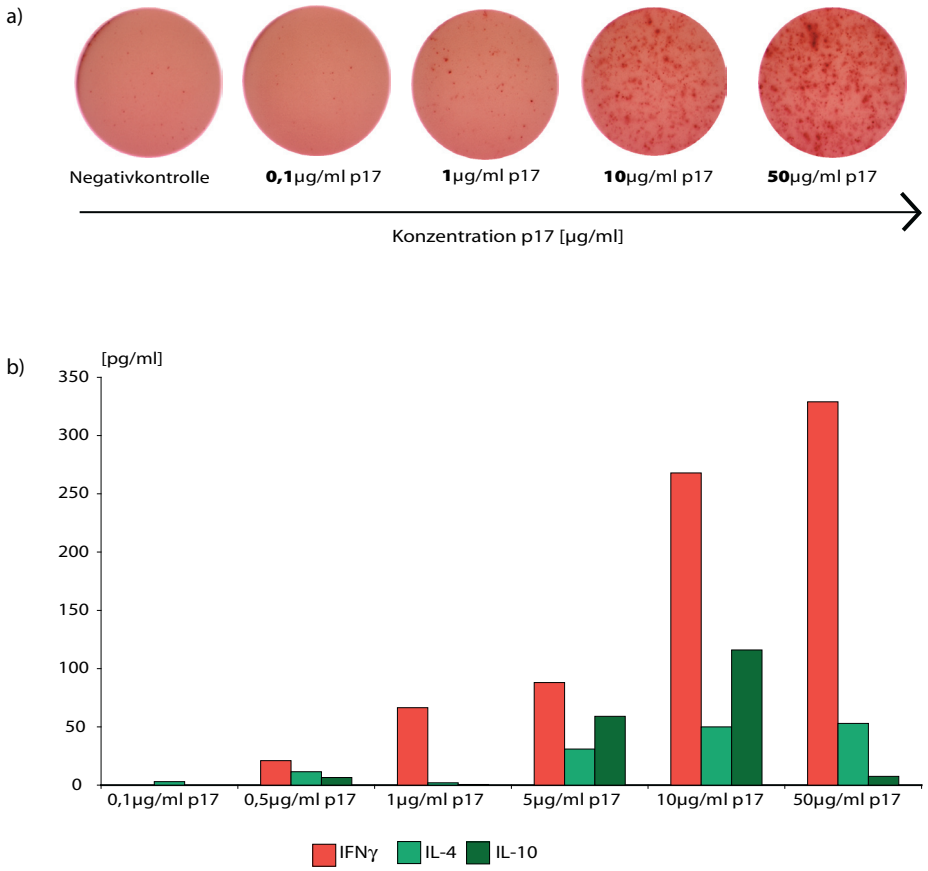


Abbildung 13: Zytokin Sekretion von SD52c1 nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid C18-A1 (p17). Dargestellt ist a) die Anzahl an IFNγ sezernierenden Zellen, gemessen durch ELISPOT b) die Zunahme an sezernierten Zytokinen im Zellkulturüberstand in pg/ml. TNF = Tumornekrosefaktor; IFN = Interferon; IL = Interleukin.

3.1.5 Natürlich prozessierte Epitope

Durch die Verwendung von autologen APC konnte durch keine Konzentration an eingesetztem Proinsulin eine Aktivierung der beiden T-Zell-Linien induziert werden. Nachdem HLA-identische dendritische Zellen als APC verwendet wurden, zeigte sich jedoch deutlich, dass sowohl Peptid C18-A1 (p17) als auch A5-21 (p21) durch natürliche Prozessierung an der Oberfläche der dendritschen Zellen präsentiert wurden. Die für die Aktivierung der Linien benötigte Konzentration an Proinsulin lag jedoch weit über der des Peptides. Der EC50 Wert lag bei Linie SD32.5 bei 5 µg/ml (Abb. 14a) und bei SD52c1 bei 10 µg/ml Proinsulin (Abb. 14b).

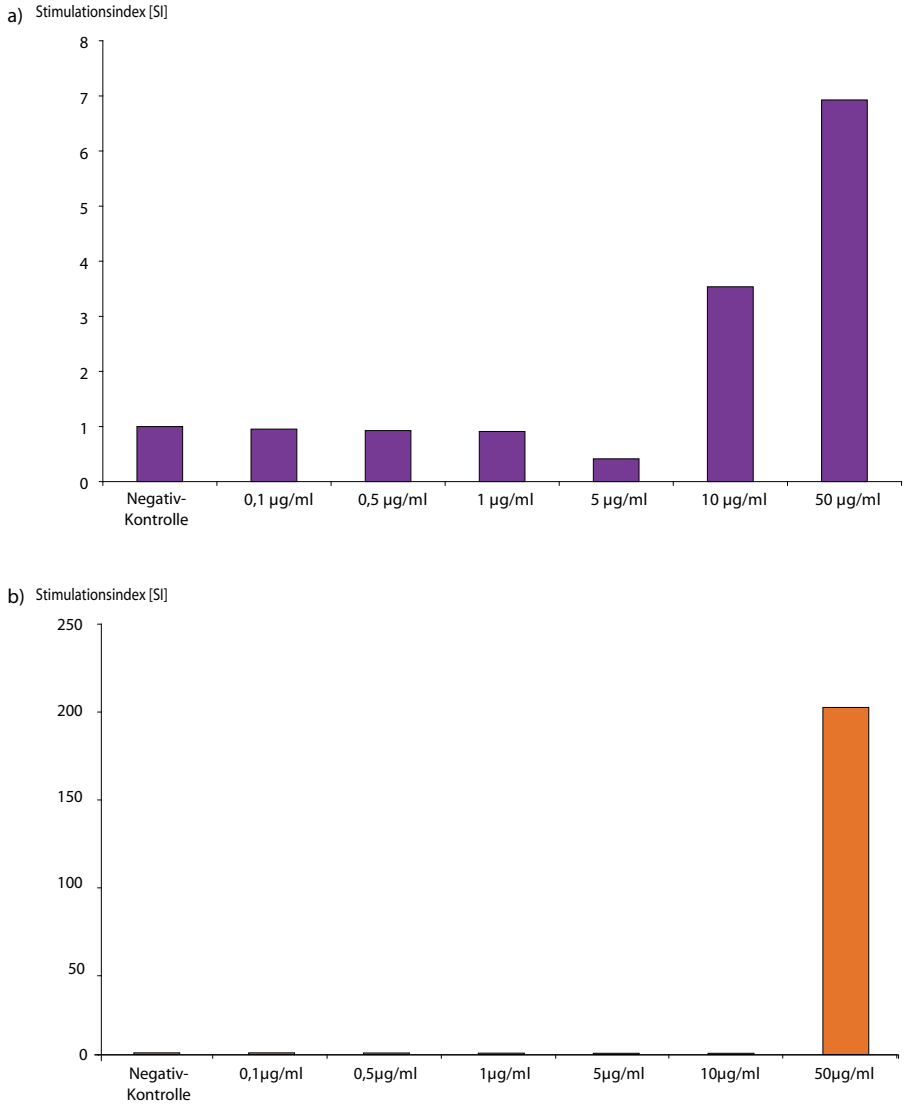


Abbildung 14: Stimulationsversuch mit dem gesamten Proinsulin-Molekül. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Triplikaten eines Proliferations-Assays bei verschiedenen Konzentrationen an Proinsulin bei a) SD32.5 bzw. b) SD52c1 bestimmt wurde. Ein SI ≥ 3 wurde als positiv gewertet.

3.1.6 Nachweis der Peptidpräsentation

Um nachzuweisen, dass die erzielten Ergebnisse durch eine klassische Signalübertragung des trimolekularen Komplexes, bestehend aus MHC, von antigenpräsentierenden Zellen gebundenem Peptid und erkennendem TZR, erzielt wurden, wurde ein Proliferations-Assay, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, mit irrelevanten (HLA-nichtidentischen) APC (Tab. 19) durchgeführt.

Tabelle 19: HLA-Haplotyp der verwendeten irrelevanten antigenpräsentierenden Zellen.

Proband	*DRB1*	*DQB1*
159A	*0701,1302	*2,0604

Sowohl bei Linie SD32.5 als auch bei SD52c1 konnte auch bei einer Konzentration von 20 µg/ml keine positive Reaktion, die durch einen Stimulationsindex von SI ≥ 3 gekennzeichnet war, festgestellt werden (Abb. 15). Dadurch konnte eine Autopräsentation durch die T-Zellen der jeweiligen Linien vor allem bei höheren Konzentrationen sicher ausgeschlossen werden.

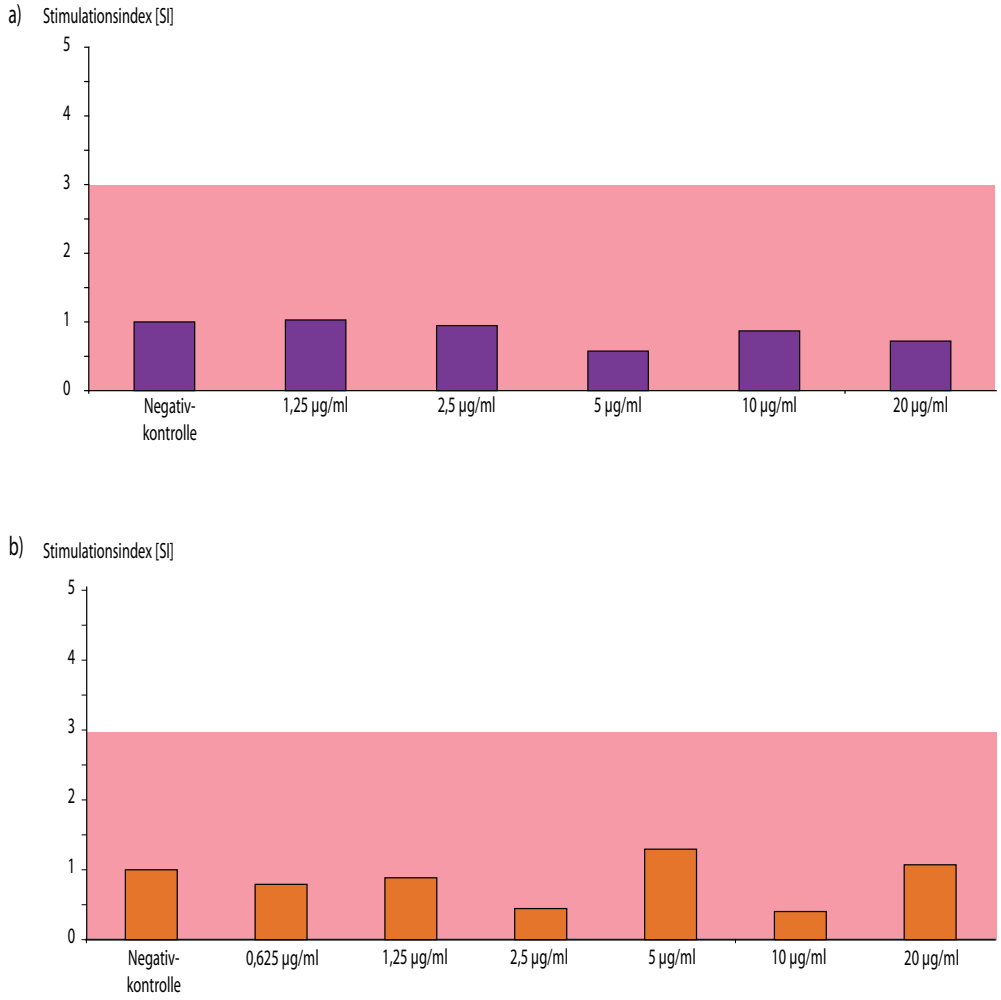


Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Kurven mit HLA-nichtidentischen antigenpräsentierenden Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI) der aus Doppelwerten eines Proliferations-Assays bei verschiedenen Konzentrationen an a) Peptid A5-21 bei SD32.5 (p21) bzw. b) Peptid C18-A1 bei SD52c1 (p17) bestimmt wurde. Ein SI < 3 (rote Markierung) weist auf keinerlei Stimulation hin.

3.1.7 Restriktionsanalyse

Blockierung der Peptidpräsentation durch HLA-Antikörper

Um die Präsentation der Peptide näher zu charakterisieren, wurden monoklonale Antikörper gegen HLA-Klasse-I und Klasse-II Moleküle zur potentiellen Blockade der Peptidpräsentation in einem Proliferationstest eingesetzt. Bei beiden T-Zell-Linien führte die Zugabe des anti-HLA-DR Antikörpers (L243) zu einer eindeutigen Hemmung der T-Zell Proliferation. Die Hemmung der Proliferation lag sowohl bei Linie SD32.5, als auch bei SD52c1 bei 100 % (Abb. 16a/b).

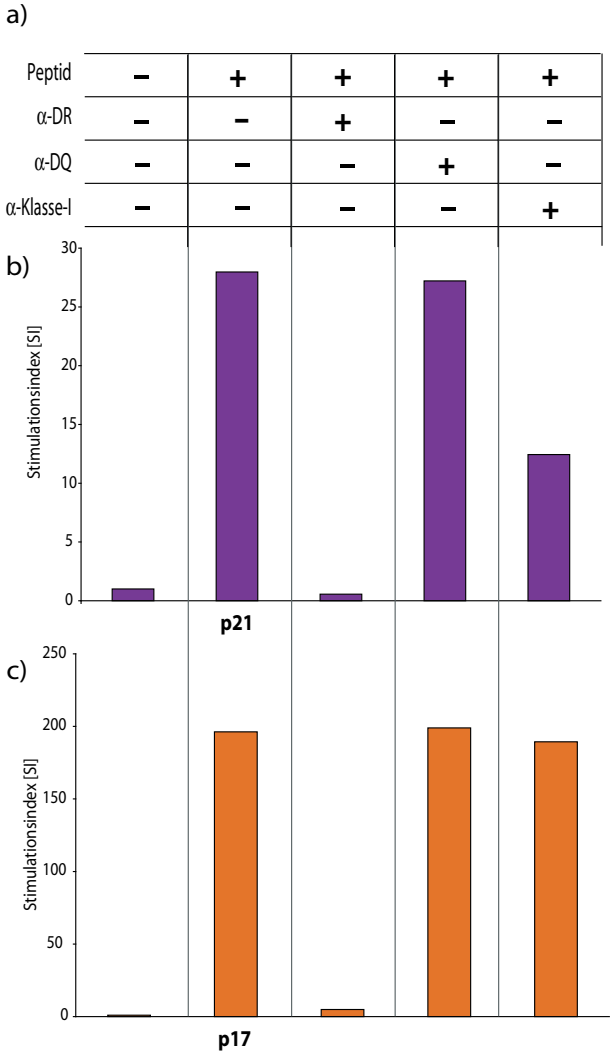


Abbildung 16: Blockierung der Peptidpräsentation durch anti-HLA-Antikörper. a) Pipettierschema des Versuchsansatzes. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Doppelwerten eines Proliferations-Assays bei einer Konzentration von 10 µg/ml an b) Peptid A5-21 (p21) bei SD32.5 bzw. c) Peptid C18-A1 bei SD52c1 (p17) bestimmt wurde. Dabei wurden verschiedene monoklonale Antikörper in dem Proliferations-Assay eingesetzt. Ein SI ≥ 3 wurde als positiv gewertet. α- = anti-HLA; p = Peptid

Dagegen hemmte weder der anti-HLA-DQ Antikörper (SPVL3), noch der anti-HLA-Klasse-I Antikörper (W32/6) die Proliferation der Linie SD52c1 nach Stimulation mit C18-A1 (p17). Bei Linie SD32.5 bewirkte der anti-HLA-Klasse-I Antikörper (W32/6) eine 50%-ige Hemmung, während der anti-HLA-DQ Antikörper (SPVL3) keinen Einfluss auf die Proliferation nach Stimulation mit Peptid A5-21 (p21) hatte.

Aus den Inhibitionsdaten lässt sich schließen, dass die Peptidpräsentation von Linie SD52c1 ausschließlich durch HLA-DR restringiert war. Für Linie SD32.5 war im wesentlichen HLA-DR an der Peptidpräsentation beteiligt, allerdings konnte aus diesen Ergebnissen eine Beteiligung von HLA-Klasse-I Molekülen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Spezifische Charakterisierung der HLA-Restriktion

Wegen der Co-Expression von zwei verschiedenen β-Ketten im DR4 Haplotyp, wurden weitere Analysen mit transfizierten Mausfibroblasten (L-Zellen) bzw. EBV-transfizierten B-Zellen durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.4).

Nach Zugabe der T-Zellen zu den jeweiligen Mausfibroblasten-Linien in Medium blieben die nativ adhärenten L-Zellen adhärent. Bei zusätzlicher Präsenz der jeweiligen Peptide zeigte sich, wenn die L-Zellen in der Lage waren, den T-Zellen von SD32.5 bzw. SD52 die jeweiligen Peptide zu präsentieren, eine spezifische Lyse der L-Zellen. Exemplarisch für die visuelle Beurteilung ist in Abb. 17 von SD52c1 in Anwesenheit der L17.8 L-Zell Linie (siehe Kapitel 2.3.4) eine Mediumkontrolle und ein Ansatz mit Peptid C18-A1 (p17) dargestellt.

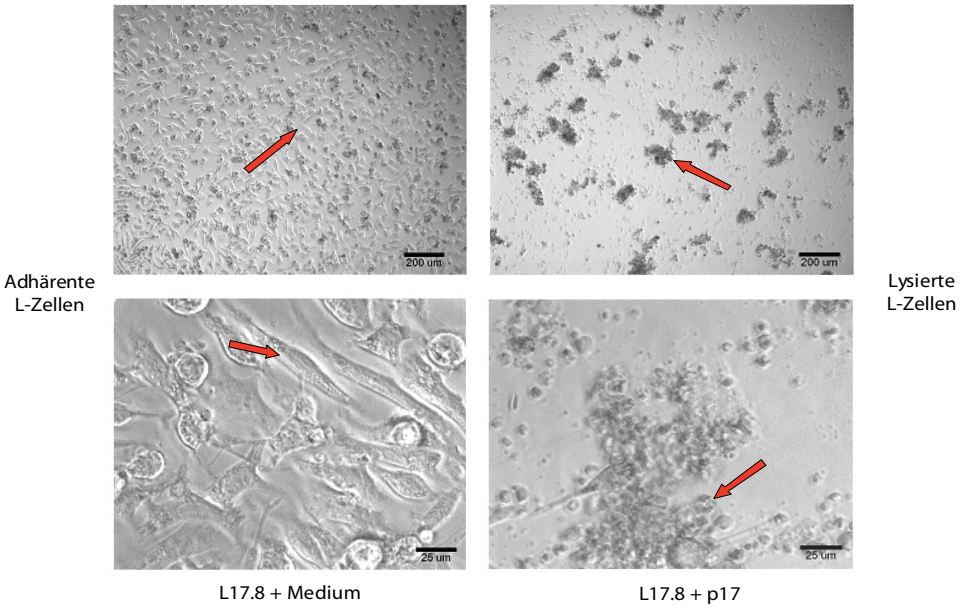


Abbildung 17: Spezifische Lyse von L-Zellen (Mausfibroblasten) durch T-Zellen von SD52c1 nach Stimulation mit 10 µg/ml Peptid C18-A1 (p17). Dargestellt ist der Zustand von adhärenten L-Zellen nach Inkubation mit Medium bzw. Peptid C18-A1 (p17) und den Zellen von SD52c1.

Diese visuelle Beobachtung korrelierte positiv mit einem Anstieg an sezerniertem IFNγ, der aus den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt wurde. Aus diesen Ergebnissen konnte für die Linie SD32.5 das HLA-DRB1*0401 Molekül als Restriktionselement eindeutig identifiziert werden (Abb. 18).

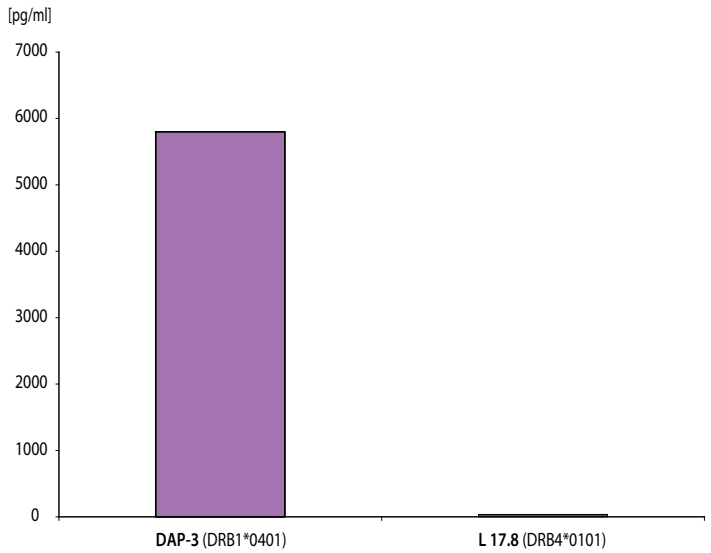


Abbildung 18: Zunahme der IFNγ Sekretion von SD32.5 nach Stimulation mit 10 µg/ml Peptid A5-21 (p21) unter Verwendung von HLA-transfizierten L-Zellen. Dargestellt ist die Menge an sezerniertem IFNγ in pg/ml im Zellkulturüberstand. DAP-3 = HLA-DRB1*0401 tragende L-Zell-Linie; L17.8 = HLA-DRB4*0101 tragende L-Zell-Linie; IFN = Interferon.

Eine weitere Bestätigung dieser *in vitro* Daten ergab eine computersimulierte Analyse bezüglich einer hochaffinen Bindungsmöglichkeit verschiedener PPI-Peptide, wie z.B. A5-21, an HLA-DRB1*0401, die in Tabelle 24 des Kapitels 3.2.7 beschrieben ist.

Sowohl die visuelle Beobachtung bei SD52c1 als auch die in Abb. 19 gezeigten Mengen an sezerniertem IFNγ erbrachten eine dominante Reaktion unter Verwendung der DAP-3 Linie (DRB1*0401). Jedoch waren auch die Zellen der Linie L17.8 (DRB4*0101) in der Lage das Peptid C18-A1 zu präsentieren. Die Verwendung der DAP-3 Zellen als APC zeigte mit einer Menge von 900 pg/ml jedoch eine stärkere IFNγ Sekretion (Abb. 19).

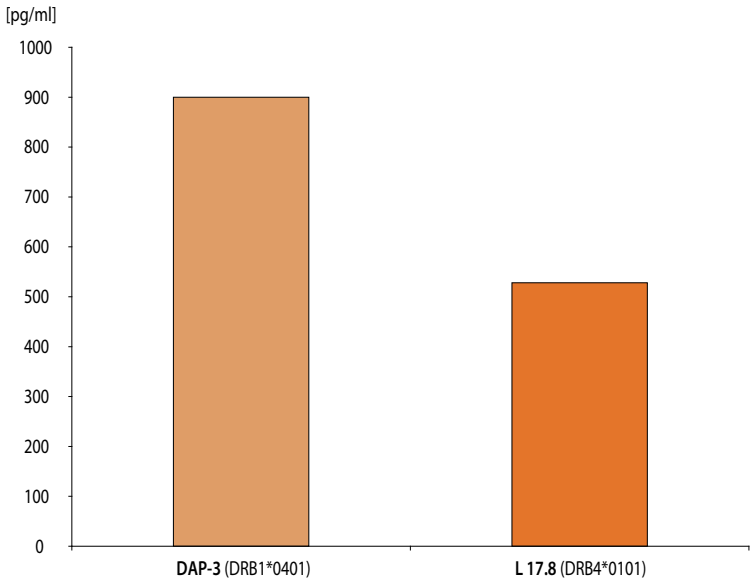


Abbildung 19*:* Zunahme der IFNγ Sekretion von SD52c1 nach Stimulation mit 10 µg/ml Peptid C18-A1 (p17) unter Verwendung von transfizierten L-Zellen. Dargestellt ist die Menge an sezerniertem IFNγ in pg/ml im Zellkulturüberstand. DAP-3 = HLA-DRB1*0401 tragende L-Zell-Linie; L17.8 = HLA-DRB4*0101 tragende L-Zell-Linie; IFN = Interferon.

Um ein klares Ergebnis zu erlangen, wurde mit Klon SD52c1 unter Verwendung von EBV-transfizierten B-Zellen als APC ein Proliferations-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.4). Auch hier zeigte sich als dominantes Restriktionsmolekül HLA-DRB1*0401. Durch die Präsentation des Peptides C18-A1 über DRB1*0401 wurde ein Stimulationsindex (SI) von 21 erreicht. Das Peptid C18-A1 konnte aber auch in diesem Versuch durch HLA-DRB4*0101 präsentiert werden (SI = 7). In Abbildung 20 sind die Stimulationsindizes als Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dargestellt.

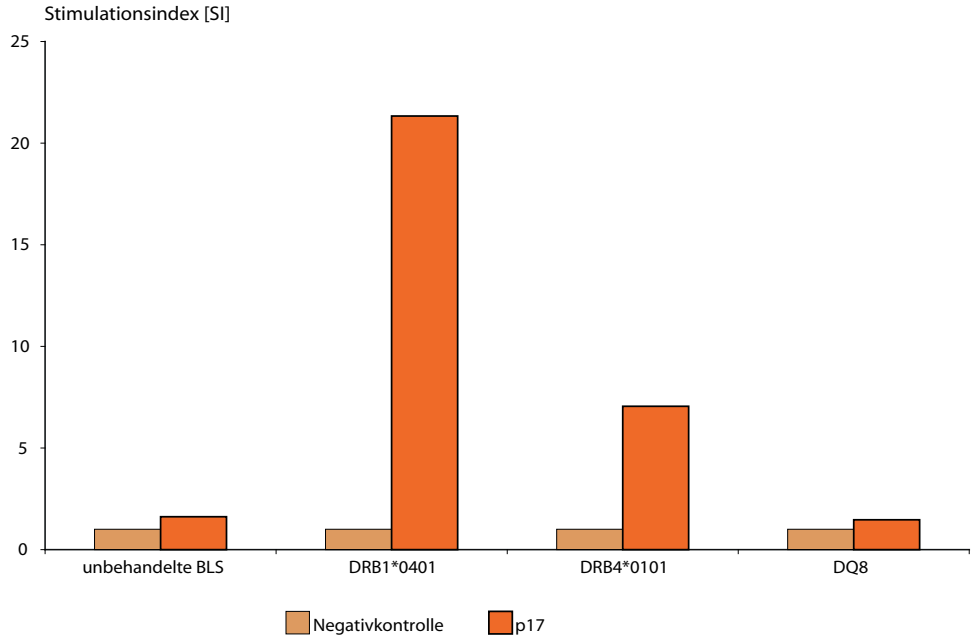


Abbildung 20: Peptidpräsentation durch EBV-transfizierte B-Zell-Linien bei SD52c1. Dargestellt ist der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Triplikaten eines Proliferations-Assays bei einer Konzentration von 10 µg/ml an Peptid C18-A1 (p17) bei SD52c1 bestimmt wurde. Dabei wurden verschiedene B-Zell-Linien (BLS) als antigenpräsentierende Zellen in dem Proliferations-Assay eingesetzt. Ein SI ≥ 3 wurde als positiv gewertet.

3.1.8 Epitop Mapping

Untersuchung der Bindungselemente des Peptides A5-21 bei SD32.5

Es hat sich gezeigt, dass bereits durch Peptid p18 (C23-A6) bei der A5-21 spezifischen Linie SD32.5 ein Stimulationsindex (SI) von 4 erreicht wurde. Mit dem um 12 Aminosäuren (AS) überlappenden Peptid p20 (A1-17) wurde ein SI von 24 erreicht. Der SI nach Stimulation mit p21 (A5-21) war jedoch mit einem Wert von 173 sieben mal höher als der von p20 (A1-17). Alle anderen Peptide der Signalsequenz, der B-Kette und des C- Peptides konnten keine Aktivierung von SD32.5 induzieren (Abb. 21).

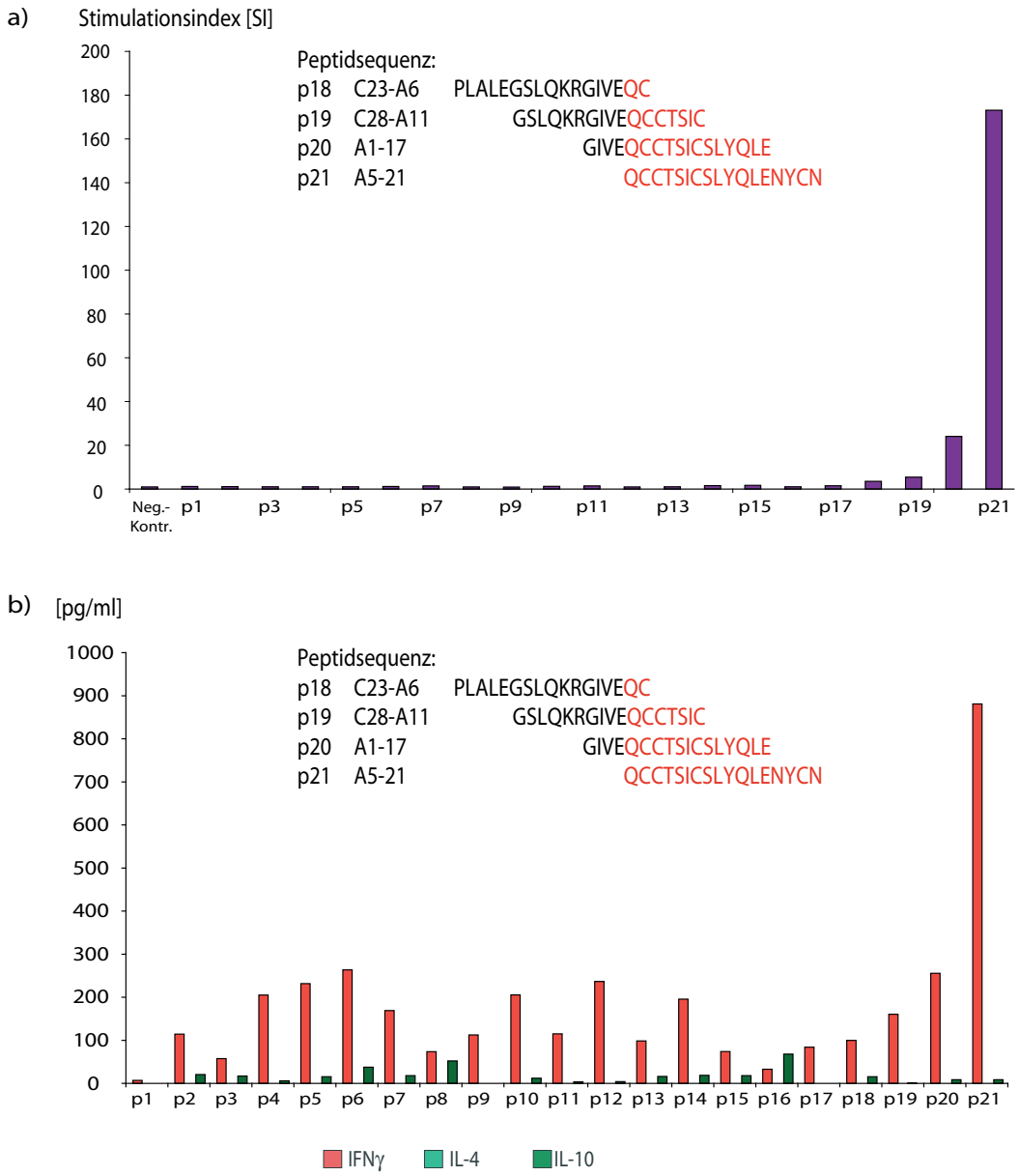


Abbildung 21: Crossreaktivitäten von SD32.5. Dargestellt ist a) der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Doppelwerten eines Proliferations-Assays bestimmt wurde und b) die Zunahme an sezernierten Zytokinen im Zellkulturüberstand in pg/ml. Dabei wurden jeweils 10 µg/ml der PPI-Peptide p1-21 eingesetzt. Zusätzlich ist jeweils die Aminosäuresequenz der aktivierenden Peptide dargestellt, wobei in rot die, für die Bindung wichtigen Elemente, gekennzeichnet sind. IFN: Interferon; IL: Interleukin; p: Peptid; A: Insulin A-Kette; C: C-Peptid.

Die Ergebnisse zeigen, dass zu einer minimalen Aktivierung die Carboxy-terminale Sequenz von Peptid p18 (C23-A6: QC) benötigt wurden. Die folgenden AS von Peptid p19 (C28-A11: CTSIC) schienen keine weiteren Bindungselemente zu enthalten, da der SI im Vergleich zu p18 nicht angestiegen ist. Die Sequenz von Peptid p20 (A1-17: SLYQ-LE) enthielt wiederum weitere wichtige Bindungselemente für eine Aktivierung.

Die maximale Kapazität die Linie SD32.5 zu aktivieren, dass heißt, die gesamten für eine Aktivierung nötigen Bindungselemente, besaß jedoch ausschließlich Peptid A5-21 (p21). Die Analyse der Zytokine zeigte eine entsprechend den Proliferationsergebnissen zunehmende Sekretion an IFNγ nach Stimulation mit den Peptiden p18-20, obwohl eine IFNγ Sekretion in geringem Maße auch von anderen Peptiden induziert werden konnte. Die Stimulation mit p21 induzierte die stärkste IFNγ Sekretion. Eine IL-4 bzw. IL-10 Sekretion wurde durch keines der eingesetzten Peptide hervorgerufen (Abb. 21b).

Untersuchung der Bindungselemente des Peptides C18-A1 bei SD52c1

Auf der Grundlage der Stimulationsindizes zeigte sich, dass nur Peptid 17 (C18-A1) in der Lage war, eine Aktivierung der Linie SD52c1 zu induzieren (Abb. 22a). Daraus ergab sich der Schluss, dass wichtige Bindungselemente für eine Aktivierung in den überlappenden Sequenzen fehlen mußten. Eine deutliche Sekretion des dominanten Zytokins IFNγ konnte ebenfalls nur durch Peptid p17 (C18-A1) induziert werden. (Abb. 22b). Bei diesem Versuch wurden zusätzlich die Zytokine TNFα und IL-5 bestimmt. Es zeigte sich eine außerordentlich starke IL-5 Sekretion, die quantitativ viel höher als die IFNγ Sekretion war. TNFα war kaum zu dedektieren.

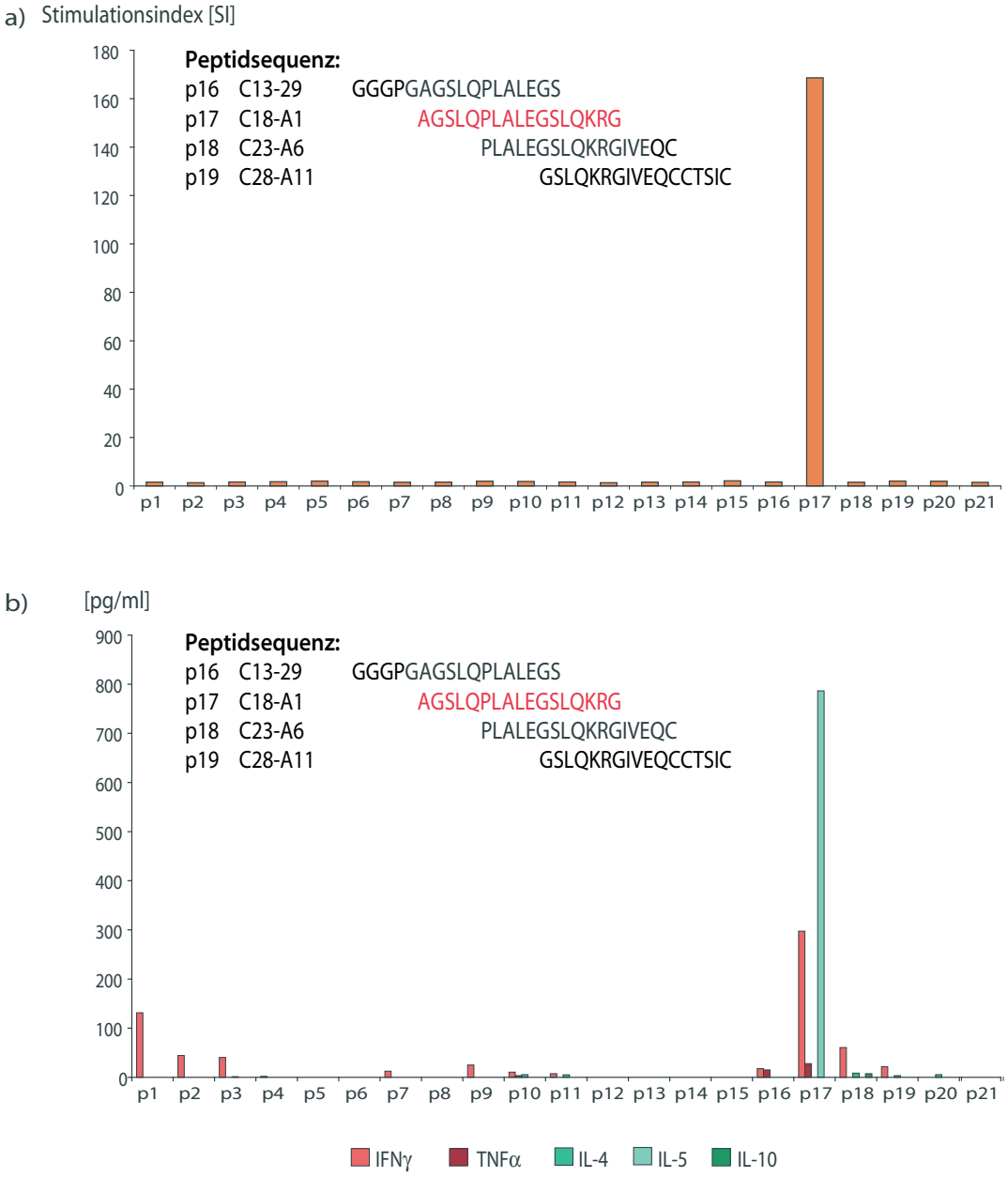


Abbildung 22: Crossreaktivitäten von SD52c1. Dargestellt ist a) der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Doppelwerten eines Proliferations-Assays bestimmt wurde und b) die Zunahme der sezernierten Zytokinen im Zellkulturüberstand in pg/ml. Dabei wurden jeweils 10 µg/ml der PPI-Peptide p1-21 eingesetzt. Zusätzlich ist jeweils die Aminosäuresequenz der aktivierenden Peptide dargestellt, wobei in rot die, für die Bindung wichtigen Elemente, gekennzeichnet sind. TNF; Tumornekrosefaktor; IFN: Interferon; IL: Interleukin; p: Peptid; A: Insulin A-Kette; C: C-Peptid.

Spezifische Untersuchung der Peptidbindungselemente durch Alanin Scan-Peptide

In Peptid C18-A1 befinden sich Aminosäuren, die an der MHC-Bindung beteiligt sind und solche die mit dem TZR interagieren, wobei beide für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind.

Um die Aminosäuren von Peptid C18-A1, die für eine Aktivierung der Linie SD52c1 verantwortlich sind, zu definieren, wurden durch Alanin substituierte Peptide (siehe Tab. 4b Kapitel 2.1.9) in den Proliferations-Assay eingesetzt. Die Ergebnisse des Proliferations-Assays bzw. der Zytokinanalyse sind in Abb. 23 dargestellt.

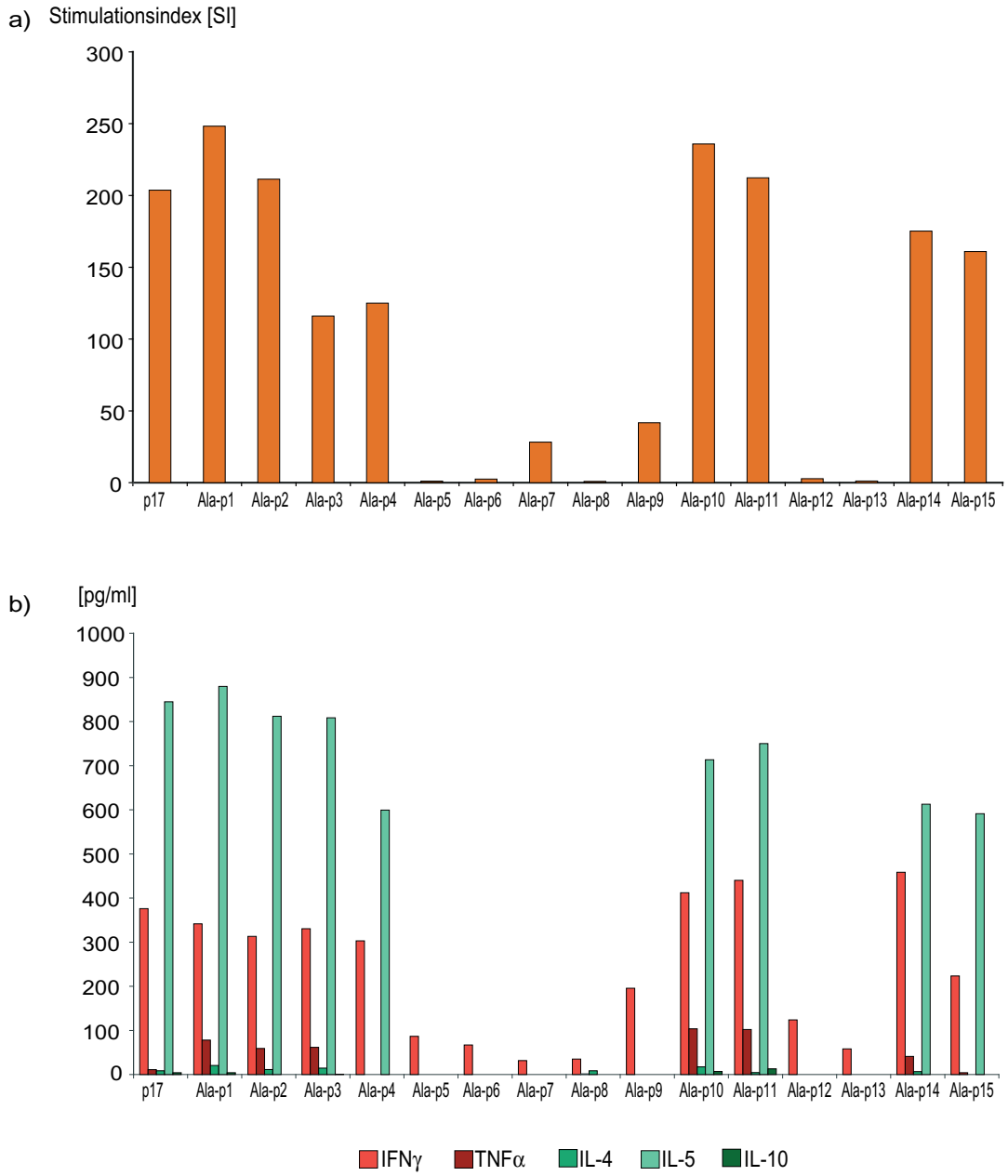


Abbildung 23: Definierung der für die Peptid-Bindung wichtigen Positionen. Dargestellt ist a) der Mittelwert der Stimulationsindizes (SI), der aus Doppelwerten eines Proliferations-Assays bestimmt wurde und b) die Zunahme an sezernierten Zytokinen im Zellkulturüberstand in pg/ ml. Dabei wurden jeweils 10 µg/ml der Alanin substituierten Peptide Ala-p1-15 eingesetzt. TNF = Tumornekrosefaktor; IFN = Interferon; IL = Interleukin.

Alanin-Substitutionen der amino-terminalen Aminosäure-Positionen 2 und 3 (GS), den beiden carboxy-terminalen Aminosäuren (RG) und den AS-Positionen 12 und 13 (SL) wurden bezüglich der Aktivierung von SD52c1 toleriert. Die Substitution an AS-Position 4 und 5 (LQ) bewirkte eine 50%-ige Reduzierung der Kapazität die Linie SD52c1 zu aktivieren. Alle anderen Alanin-Substitutionen führten zu einem beträchtlichen oder sogar kompletten Verlust der Aktivierungsfähigkeit. Durch den Austausch dieser Aminosäuren durch Alanin wurde sowohl die dominante IFNγ und IL-5 Sekretion, als auch die geringe IL-4 und IL-10 Sekretion gehemmt (Abb. 23b). Demzufolge konnten sieben Aminosäuren des Peptides p17 mit der Sequenz AGSLQ**PL**A**LEG**SL**Q-K**RG als essentiell für eine Aktivierung definiert werden. Zur Bedeutung der Alanine in Position 1 und 8 können keine Aussagen gemacht werden. Vor allem das Alanin in Position 8 könnte ebenfalls essentiell für die Bindung sein.

3.1.9 T-Zell-Rezeptor (TZR)-Analyse

Bestimmung der TZR-Familien

Nach in Abschnitt 2.3.6 beschriebenen Kriterien wurden alle Familien des TZR-Repertoires von Linie SD32.5, SD52c1 und von autologen PBMC bestimmt. Abbildung 24 zeigt das (CDR3) Längenverteilungsprofil der Vβ-Familien von PBMC des untersuchten Patienten.

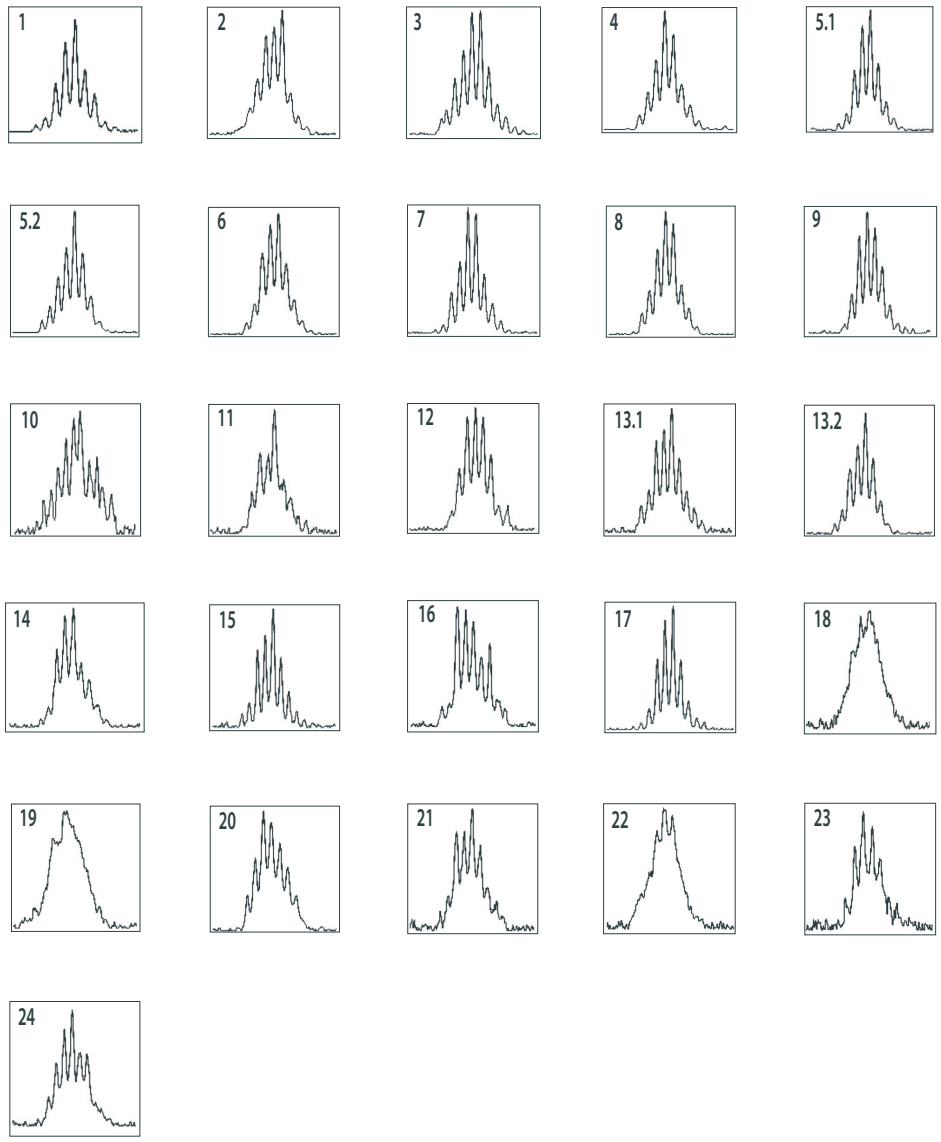


Abbildung 24: Darstellung der CDR3-Längenverteilungsmuster aller 26 T-Zellrezeptor Vβ-Familien bzw. Vβ-Subfamilien der PBMC des untersuchten Patienten. Auf der Abszisse ist die Fragmentlänge aufgetragen (ohne Einheit), auf der Ordinate die Signalintensität bzw. Peak-Höhe ohne Einheit.

Es hat sich gezeigt, dass alle 26 untersuchten Vβ-Familien bzw. Subfamilien vertreten waren und dass es sich bei allen um unauffällige CDR3-Längenverteilungsmuster, die einer Gauss´schen Verteilung ähnlich waren, handelte. Das bedeutet, dass aufgrund des Fehlens von stark expandierten klonalen Peaks keine Hinweise auf eventuelle T1D assoziierte Veränderungen im TZR Vβ-Repertoire der PBMC zu finden waren.

Im Gegensatz zu den PBMC war Linie SD32.5 nur durch den Besitz der TZR Familien Vβ14 und Vα4 charakterisiert (Abb. 25a/b), was durch eine dominante Bande gekennzeichnet war. Aus den CDR3-Verteilungsmustern geht hervor, dass es sich - wie erwar-

tet- nicht mehr um eine Normalverteilung handelte, sondern um einen expandierten monoklonalen Peak. Auf der Basis dieser molekularen Daten, war Linie SD32.5 als monoklonal zu bezeichnen.

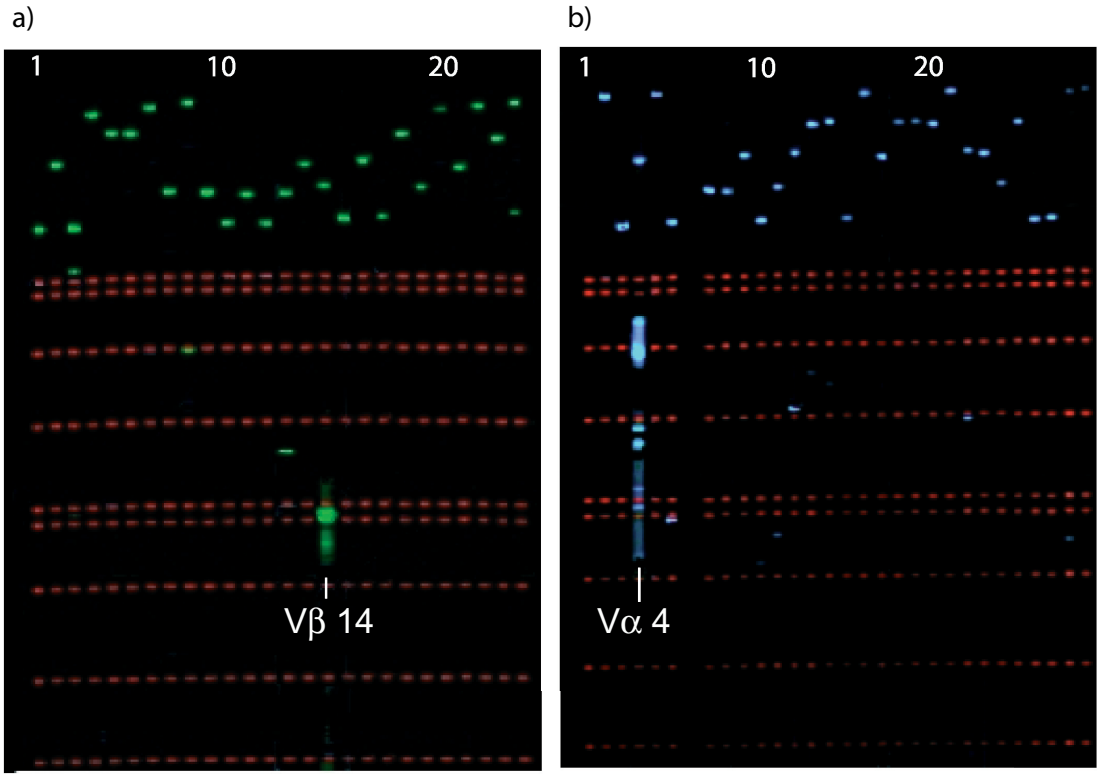


Abbildung 25: Fragmentanalyse der a) Vβ– und b) Vα–familienspezifischen PCR der cDNA von SD32.5. In der Vβ-spezifischen PCR wurden die Proben mit dem TET-markierten konstanten Primer (grün) amplifiziert, in der Vα-spezifischen PCR mit dem FAM-markierten Primer (blau). Banden über den roten Banden (GeneScan-500 TAMRA-Längenstandards) stellen die Bande für die Standards dar.

In Abb. 26 ist die Fragmentanalyse der zunächst heterogenen Linie SD52 dargestellt (siehe Kapitel 3.1.3). Auch aus der Fragmentanalyse hat sich gezeigt, dass diese Linie in dieser Phase aus mehreren Subpopulationen bestand, wodurch im Fragmentgel noch 10 von 26 TZR Vβ-Familien (Vβ 3; 4; 5.2; 6; 9; 14; 17; 18; 22 und 23) deutlich vertreten waren. Die CDR3-Längenverteilungsmuster wiesen keine Gauss´sche Verteilung mehr auf, waren jedoch auch nicht monoklonal. In Abb. 26 sind exemplarisch die Verteilungsmuster von Vβ14 und Vβ22 dargestellt.

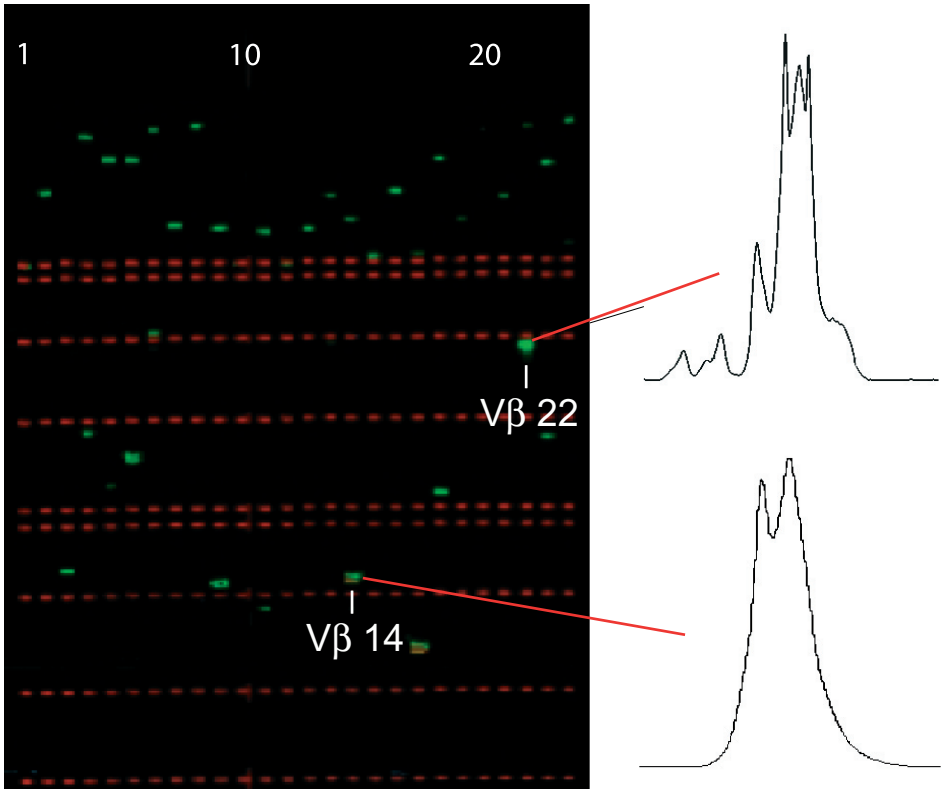


Abbildung 26: Fragmentanalyse der Vβ–familienspezifischen PCR der cDNA von SD52 und die CDR3-Verteilungsmuster von Vβ14 bzw. Vβ22. In der Vβ-spezifischen PCR wurden die Proben mit dem TET-markierten konstanten Primer (grün) amplifiziert. Banden über den roten Banden (GeneScan-500 TAMRA-Längenstandards) stellen die Bande für die Standards dar.

Aus den Ergebnissen von Kapitel 3.1.7 ging hervor, dass an der Aktivierung von Klon SD52c1 zwei Restriktionsmoleküle beteiligt sein konnten. Auch aus dem in Abb. 27a dargestellten Fragmentgel geht hervor, dass SD52c1 durch den Besitz von zwei verschiedenen Vβ-Familien gekennzeichnet war. Es hat sich gezeigt, dass die Vβ-Familien Vβ 14 bzw. Vβ 22 dominant vertreten sind. In Abb. 27b ist das Fragmentgel für die Bestimmung der Vα-Familien dargestellt. Des weiteren waren die Zellen von SD52c1 durch die Vα-Familien Vα 11 bzw.Vα 14 gekennzeichnet. Aus den zusätzlich dargestellten Längenverteilungsmustern geht hervor, dass alle dominant amplifizierten Vα-, bzw. Vβ-Familien durch einen monoklonalen Peak gekennzeichnet waren. Daher konnte nachgewiesen werden, dass es sich um eine homogene Zellpopulation handelte, die durch zwei verschiedene T-Zell-Rezeptoren gekennzeichnet war.

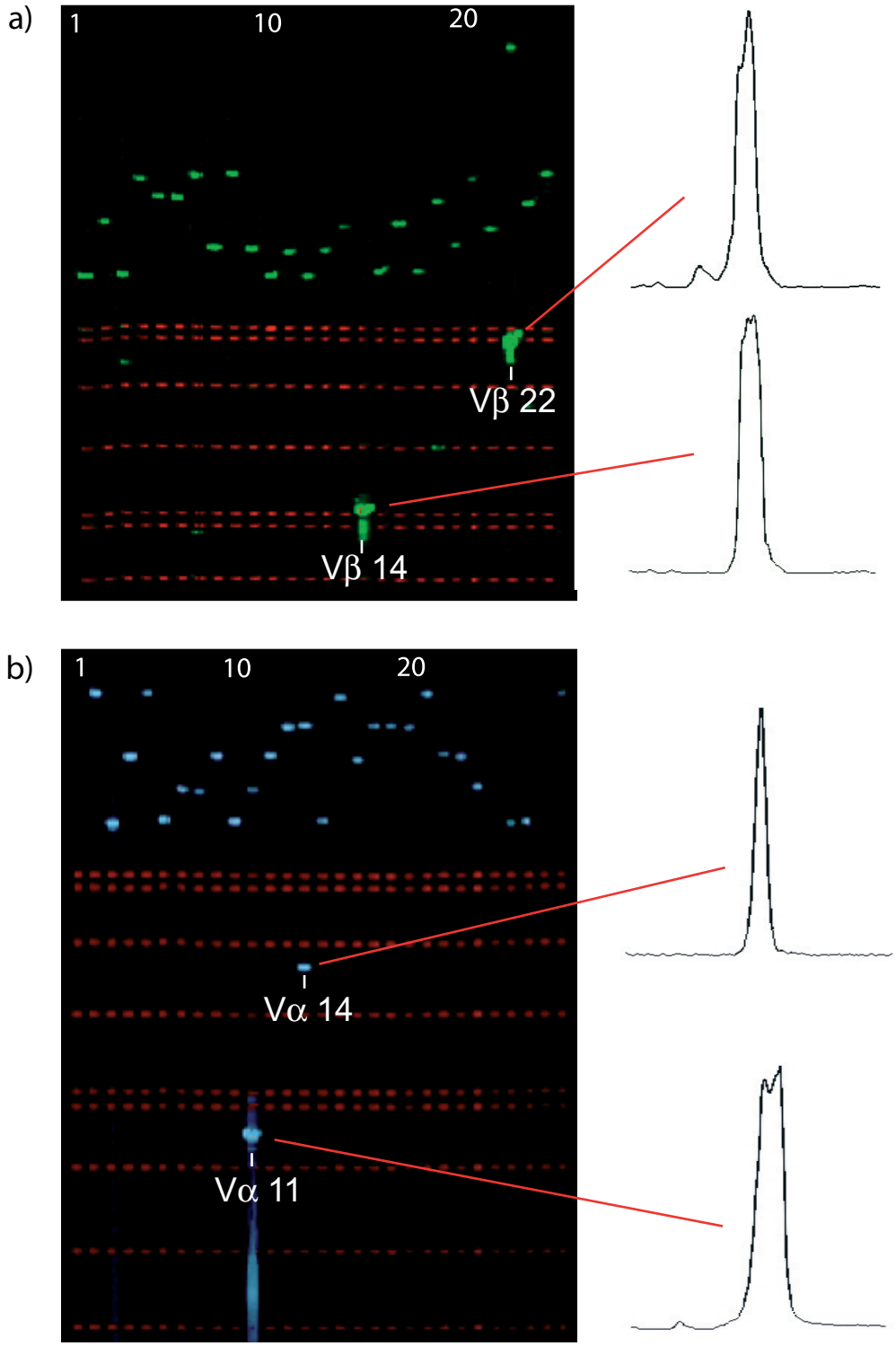


Abbildung 27: Fragmentanalyse der a) Vβ– und b) Vα–familienspezifischen PCR der cDNA von SD52c1. In der Vβ-spezifischen PCR wurden die Proben mit dem TET-markierten (grün) konstanten Primer, in der Vα-spezifischen PCR mit dem FAM-markierten (blau) Primer amplifiziert. Banden über den roten Banden (GeneScan-500 TAMRA-Längenstandards) stellen die Bande für die Standards dar. Zusätzlich sind die CDR3-Längenverteilungsmuster der Amplifikate dargestellt.

Nachweis der Co-Expression von Vβ und Vα

Um die Co-Expression der ermittelten Vβ- und Vα-Familien nachzuweisen, wurden die Zellen zunächst nach ihrer Vβ-Familie selektiert (siehe Kapitel 2.2.2). Aus diesen Zellen wurde dann nach Kriterien, die in Kapitel (2.3.6) beschrieben sind, eine familienspezifische PCR für Vα-Familien durchgeführt. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Vβ14 selektierten Zellen von SD32.5 ausschließlich durch den Besitz der Vα-Familie Vα4 gekennzeichnet sind. Auf gleiche Weise wurde mit der Subpopulation von SD52c1, die Vβ14 auf der Oberfläche trägt, verfahren. Aus der Fragmentanalyse ergab sich eine Co-Expression von Vβ14 und Vα11. Für die andere Subpopulation konnte somit eine Co-Expression von Vβ22 und Vα14 ermittelt werden.

Bestimmung der TZR -Sequenz

Die Sequenzierung ergab jeweils mindestens 10 gut lesbare Sequenzen, von denen jeweils alle identisch waren, was einem Klonalitätsgrad von 100% entspricht. Die Sequenzen gehen aus Tabelle 20 hervor. Es hat sich gezeigt, dass bei allen erhaltenen Sequenzen ein Vβ- und Jβ- bzw. Jα-nibbling nachzuweisen war (siehe Kapitel 2.3.6).

Tabelle 20a: Spektrum der erhaltenen T-Zell-Rezeptor Sequenzen bei der Analyse von SD32.5.

Zellinie	*V-Segment*	*V-nibbling*	*NDN-Region*	*J-nibbling*	*J-Segment*	*C-Segment*	*CDR3-Region in Aminosäuren*
SD32.5	AV4S2		TCTCATCCGCATA	4	AJ23*01	CA	VRVSSAYAYYNQGGKLI
SD32.5	BV14S1	5	CCTAGAGCCAA	2	BJ2S3	CB	SSPRANTDTQY

Tabelle 20b: Spektrum der erhaltenen T-Zell-Rezeptor Sequenzen bei der Analyse von SD52c1.

Zellinie	*V-Segment*	*V-nibbling*	*NDN-Region*	*J-nibbling*	*J-Segment*	*C-Segment*	*CDR3-Region in Aminosäuren*
SD52c1a	AV11S1		ACC	5	AJ42*01	CA	VDLWRKPRKSHL
SD52c1a	BV14S1	4	GGTCCTCGATTGGG	4	BJ1S5	CB	SSWSSIGNQPQH
SD52c1b	AV14S2		TCATGAAGCTTAG	3	AJ6*01	CA	FMKLRSGGSYIPT
SD52c1b	BV22S1P	10	GGTATTGGCTCGG	3	BJ1S1	CB	GIGSDTEAF

3.1.9 Phänotypisierung der Linien

Visuelle Unterschiede

Moss illustrierte in einem kürzlich erschienen Artikel [116], dass der Kontakt von T-Zellen und APC durch eine aktive Bewegung der Rezeptoren über die Membran an die Stelle der Signalübertragung, der sogenannten immunologischen Synapse, erfolgt. In Abbildung 28 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Linie SD32.5 dargestellt, die diese Aussage unterstützen.

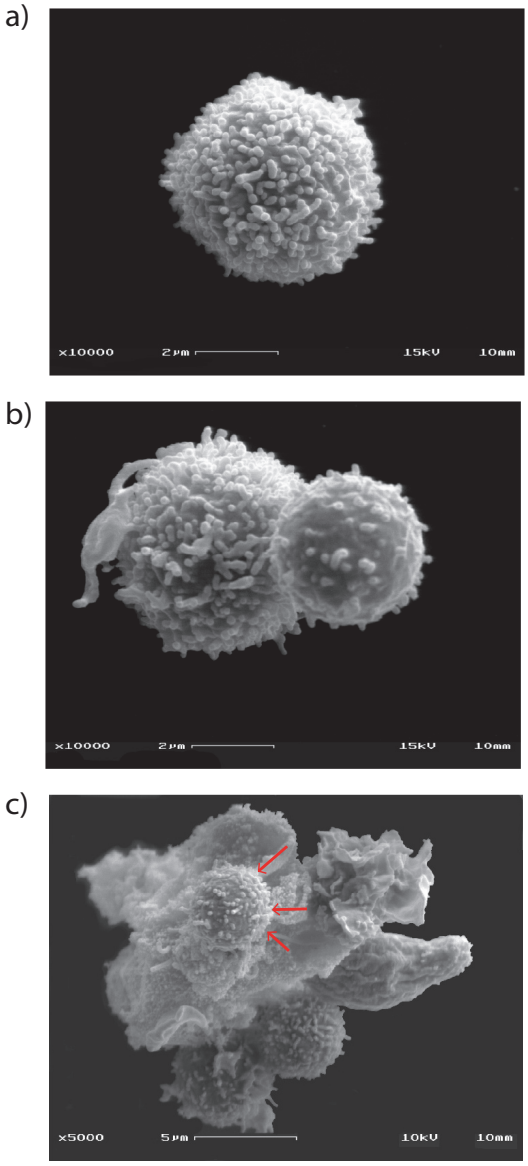


Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von a) einem einzelnen Lymphozyten b) zwei untschiedlichen Lymphozyten und c) einer Aggregation mehrerer Zellen.

Abbildung 28a zeigt einen Lymphozyten in typischer Konfiguration. In Abb. 28b sieht man eine veränderte Oberflächenstruktur des vorderen und kleineren Lymphozyten. Dies konnte durch eine geringere Anzahl an Oberflächenrezeptoren, die eine spezifische Linie aufweist, erklärt werden. Abbildung 28c illustriert eine Aggregation von Lymphozyten und APC, wobei eine Verschiebung der Oberflächenstrukturen in Richtung immunologischer Synapse angedeutet war (rote Pfeile).
Die nächste Abbildung zeigt Schnitte durch die T-Zellen von SD32.5. Auch hier ist sowohl ein normaler Lymphozyt (Abb. 29a) als auch eine mögliche Kontaktstelle zweier Lymphozyten abgebildet (Abb. 29b). Aufgrund des gelappten Zellkernes lässt sich in Abb. 29b eine dendritische Zelle erkennen (untere Zelle), die mit einem Lymphozyten in Kontakt getreten ist.

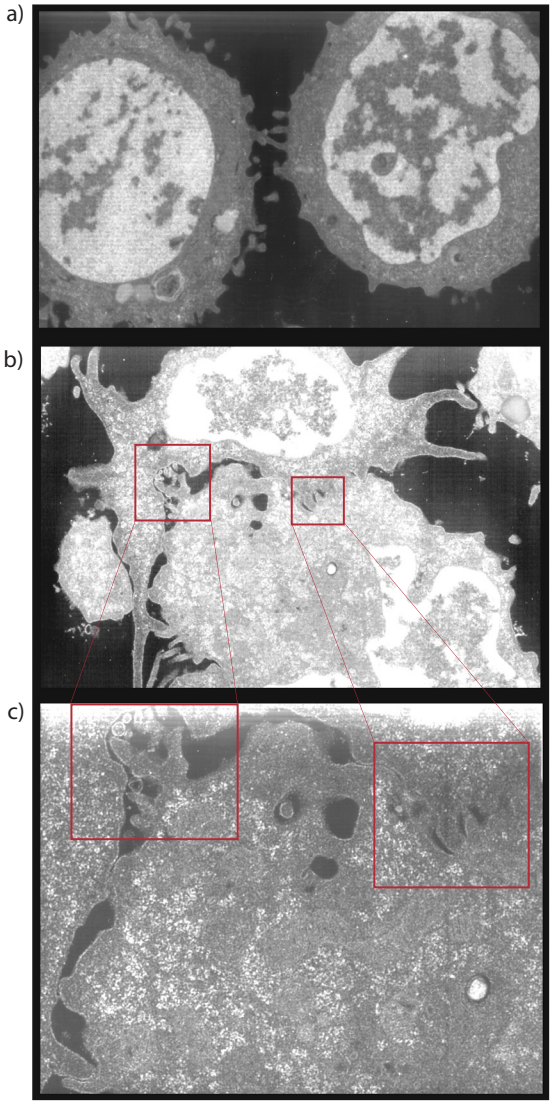


Abbildung 29 a-c: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 70 nm dicken Schnitten durch verschiedene Zellen der Linie SD32.5 bzw. autologen antigenpräsentierenden Zellen. Vergrößerungen: a) 6000 fach b) 8000 fach c) 17 000 fach

Oberflächenmarker

Aufgrund der Beteiligung von autologen APC ist der Anteil an $CD3^+$ T-Zellen vor und nach 3 Tagen Stimulation sowohl bei SD32.5 als auch bei SD52c1 gleichgeblieben (Abb. 30a/b). Jedoch kam es bei der Analyse des CD4 bzw. CD8 Markers nach 3 Tagen Stimulation zu einer Verschiebung der Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen. So wurde der Anteil an $CD4^+$ Th-Zellen im gleichen Maße größer wie der Anteil an $CD8^+$ zytotoxischen Zellen abnahm (Abb. 30a/b). Die Anzahl an $CD45RA^+$ naiv/regulatorischen Zellen nahm nach Stimulation ebenfalls ab. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl an $CD45RO^+$ Memory T-Zellen in der Negativkontrolle nach Stimulation an (Abb. 30a/b). Daher handelte es sich sowohl bei SD32.5 als auch bei SD52c1 um eine $CD4^+CD45RO^+$ T-Zell-Linie. Auf Grund der verwendeten autologen APC, hat sich die Expression von HLA-DR Molekülen nicht wesentlich erhöht (Abb. 30a).

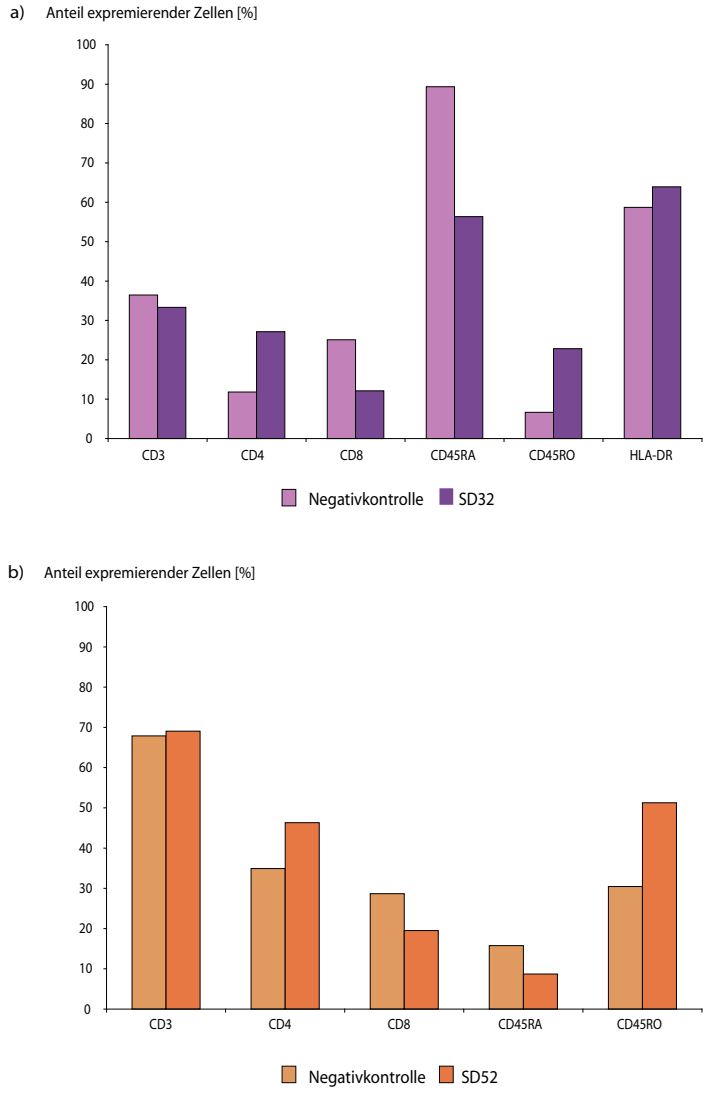


Abbildung 30: Charakterisierung verschiedener Oberflächenmarker bei a) SD32.5 und b) SD52c1. Dargestellt ist der Anteil an exprimierenenden Zellen in Prozent vor und nach Stimulation mit 10 µg/ml a) Peptid A5-21 (p21) bzw. b) Peptid C18-A1 (p17).

Aus der Charakterisierung des Phänotyps von SD32.5 hat sich ergeben, dass alle eingesetzten Aktivierungsmarker, mit Ausnahme von CD38, hochreguliert wurden (Abb. 31).

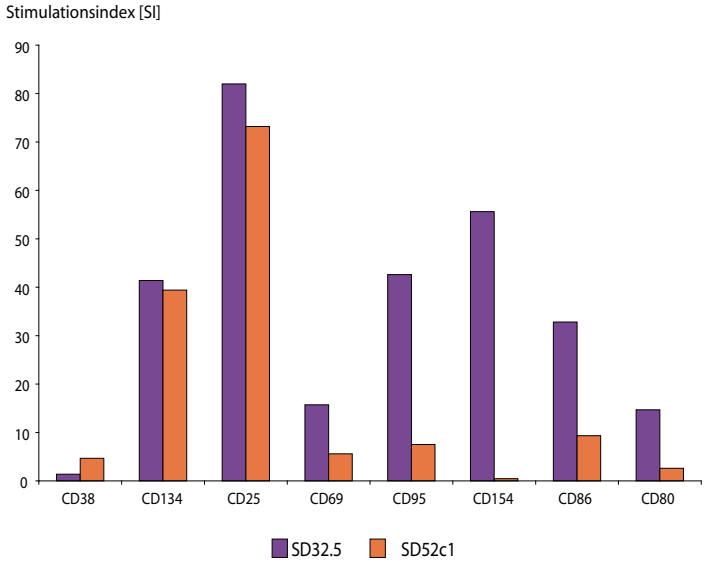


Abbildung 31: Charakterisierung von Aktivierungsmarkern bei SD32.5 und SD52c1. Dargestellt ist der Anteil an exprimierenenden Zellen nach Stimulation mit 10 µg/ml Peptid A5-21 (p21) bei SD32.5 bzw. Peptid C18-A1 (p17) bei SD52c1. Dargestellt ist der Stimulationsindex (SI), der sich aus dem Anteil exprimierender Zellen nach Stimulation mit 10 µg/ml Peptid A5-21 (p21) bzw. Peptid C18-A1 (p17) dividiert durch den Anteil exprimierender Zellen der Negativkontrolle berechnet. Ein SI ≥ 3 wurde als positiv gewertet.

Eine Stimulation der Zell-Linie SD32.5 mit Peptid A5-21 mittels der Peptidpräsentation durch APC induzierte die Hochregulierung von CD154 (SI = 55), dem Marker für aktivierte T-Zellen. Eine Zunahme exprimierender Zellen zeigte die Analyse des CD95 (SI = 43) Markers, der auf T-Zell-Linien exprimiert ist. Die hochregulierte Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80, die auf B-Zellen exprimiert, und CD86, die auf dendritischen Zellen exprimiert werden, weist auf die Hilfe dieser Zellen bei der Peptidpräsentation hin. Die Aktivierungsmarker CD25 und CD134 werden neben CD154 am stärksten hochreguliert (SI = 82 bzw. SI = 42). Erstaunlicherweise konnte mit dem bisher in der Literatur favorisierten Aktivierungsmarker CD69 [181] lediglich eine geringe T-Zell Aktivierung nachgewiesen werden (SI = 15). Für die Aktivierungsmarker CD25 und CD134 konnten bei der Analyse von SD52c1 die gleichen Ergebnisse wie bei SD32.5 nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Zellen von SD52c1 in Anwesenheit von autologen APC und dem Peptid C18-A1 (p17) zeigte sich ein Stimulationsindex von 39,4 bei CD134 bzw. 73,2 bei CD25. Die Marker CD38, CD69, CD95 und CD86 zeigten ebenfalls eine positive Stimulation, jedoch lag der Stimulationsindex weit unter dem von CD25 und CD134. Die Stimulation durch C18-A1 von SD52c1 zeigte keine Auswirkung auf die Hochregulierung von CD154 und CD80.

3.2 Populationsstudie

3.2.1 Deskriptive Statistik der Studienpopulationen

Insgesamt konnten 12 gesunde Probanden, 24 Patienten mit einer gesicherten T1D-Diagnose, drei Prädiabetiker mit humoralen Markern (Autoantikörper) für einen beginnenden Autoimmunprozess und vier T2D-Patienten in die Studie aufgenommen werden. Die demographischen Daten sind in Tab. 21 aufgelistet.

Tabelle 21: Demographische Daten der Studienpopulation Typ 1 Diabetes (T1D)-Patienten insgesamt, sowie der einzelnen Gruppen (EM = erstmanifestiert, T1D>1J = T1D länger als ein Jahr). Angegeben sind Mittelwert (MW), Standardabweichung (StdAbw.), Median, Maximum (Max.), Minimum (Min.) und Interquartilrange (IQR) des 1. bis 3. Quartils. Cut-off Werte der Antikörpertiter: GADA 3,9 KU/l; IA-2A 1,85 KU/l; IAA 281,48 µU/l; ICA 20 JDFU.

Parameter	*Diagnose*	*MW*	*StdAbw.*	*Median*	*Min.*	*Max.*	*IQR*
Alter [Jahre]	T1D gesamt	30,9	11,1	29	10	61	13,5
	T1D-EM	30	12,9	27	10	61	16,5
	T1D>1J	33	5,3	31	27	41	8
GADA [KU/L]	T1D gesamt	32,6	29,97	33,7	0,2	101,4	47,3
	T1D-EM	34,9	34,3	14,95	0,2	101,4	61,2
	T1D>1J	27,8	18,8	33,7	0,2	52,1	25,2
IA-2A [KU/L]	T1D gesamt	89,4	175,4	1,3	0,3	559,9	87,2
	T1D-EM	112,5	208,1	1,3	0,3	559,9	73,6
	T1D>1J	40,02	49,5	0,8	0,3	95,5	93,2
IAA [µU/L]	T1D gesamt	2540,3	3820,5	251,4	0,7	13717,1	6034,1
	T1D-EM	1033,8	2186,4	226,3	0,7	8170,2	682,5
	T1D>1J	5768,4	4701,3	6113,3	23,4	13717,1	5878,5
ICA [JDFU]	T1D gesamt	45,5	62,1	0	0	160	80
	T1D-EM	45,3	56,3	40	0	160	80
	T1D>1J	45,7	78,1	0	0	160	120

Die Altersspanne in der Untersuchungsgruppe der T1D-Patienten war mit 51 Jahren (10 bis 61 Jahren) sehr weit. Das Durchschnittsalter betrug 30,9 Jahre (±11,1 Jahre). Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Probanden zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 32).

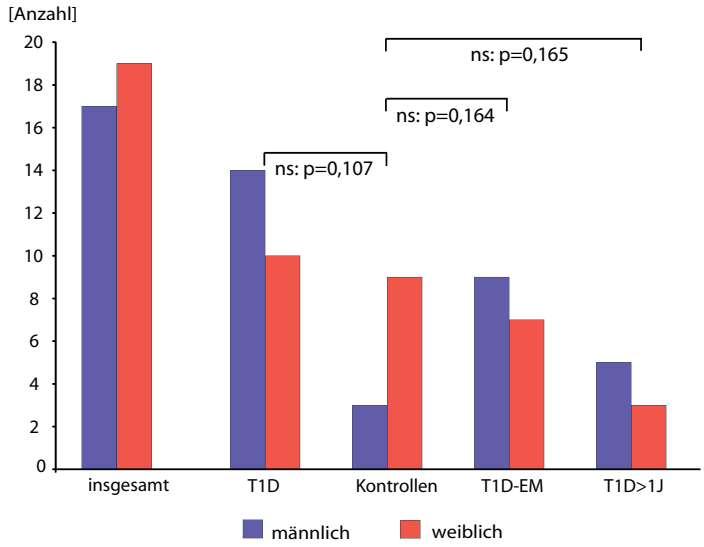


Abbildung 32: Verteilung der Geschlechter insgesamt und in den untersuchten Gruppen. Kontrollen (n=12) und Typ 1 Diabetes (T1D)-Patienten insgesamt (n=24) , sowie in den Untergruppen T1D-EM (n=16; EM = erstmanifestiert) und T1D > 1J (n=8; Gruppe von Patienten mit T1D über ein Jahr). Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

In der Gruppe der gesunden Probanden (Tab. 22) lag das Durchschnittsalter bei 35 Jahren (± 10,4 Jahre). Aufgrund des Gesundheitsstatus waren die Antikörpertiter der Kontrollpersonen negativ. Die Anzahl der weiblichen Probanden unterschied sich nicht signifikant von der männlicher Probanden (Abb. 32).

Tabelle 22: Demographische Daten der Gruppe „Kontrollpersonen (KP)". Angegeben sind Mittelwert (MW), Standardabweichung (StdAbw.), Median, Maximum (Max.), Minimum (Min.) und Interquartilrange (IQR) des 1. bis 3. Quartils. Cut-off Werte der Antikörpertiter: GADA 3,9 KU/l; IA-2A 1,85 KU/l; IAA 281,48 µU/l; ICA 20 JDFU.

Parameter	*Diagnose*	*MW*	*StdAbw.*	*Median*	*Min.*	*Max.*	*IQR*
Alter	KP	35	10,4	29	24	59	15,5
GADA [KU/L]	KP	0,24	0,12	0,15	0,15	0,42	0,24
IA-2A [KU/L]	KP	0,31	0,09	0,27	0,27	0,52	0,045
IAA [µU/L]	KP	37,65	40,13	32,67	-3,91	115,03	49,97
ICA [JDFU]	KP	0	0	0	0	0	0

Sowohl in der Gruppe der Ak+ Probanden, als auch in der Gruppe der T2D-Patienten konnten nur drei bzw. vier Probanden aufgenommen werden. Daher war eine statistische Auswertung der Verteilung von männlichen und weiblichen Probanden nicht sinnvoll. Außerdem gibt es keine Hinweise auf eine Geschlechtsspezifigkeit bei Typ 1 Diabetes. In der Gruppe der Ak+ Probanden zeigten sich erhöhte Antikörpertiter. Die T2D-Patienten zeigten dagegen wie erwartet keine erhöhten Ak-Titer, da Typ 2 Diabetes nicht auf einer autoimmunen Grundlage beruht. Auf Grund der geringen Fallzahl innerhalb der beiden Gruppen sind in Tab. 23 die demographischen Daten jedes Probanden aufgeführt.

Tabelle 23: Demographische Daten der Gruppen „Antikörper positive Probanden (Ak+)" und Typ 2 Diabetes (T2D)-Patienten. Angegeben sind die individuellen Daten. Cut-off Werte der Antikörpertiter: GADA 3,9 KU/l; IA-2A 1,85 KU/l; IAA 281,48 µU/l; ICA 20 JDFU.

Parameter	*Ak+1*	*Ak+2*	*Ak+3*	*T2D-1*	*T2D-2*	*T2D-3*	*T2D-4*
Geschlecht	m	m	w	w	w	w	m
Alter	30	30	26	69	75	50	60
GADA [KU/L]	220,4	92,1	0,4	0,2	0,2	0,8	0,2
IA-2A [KU/L]	163,2	163,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3
IAA [µU/L]	362,6	964,7	7230,4	15,0	34,7	-5,6	171,1
ICA [JDFU]	320	160	0	0	0	0	0

3.2.2 Identifizierung geeigneter Oberflächen-Aktivierungsmarker

Aus der Phänotypisierung der Zell-Linien ergab sich, dass nach Stimulation der Linien mit dem jeweiligen spezifischen Peptid vor allem die Aktivierungsmarker CD134 und auch CD25 hochreguliert wurden. Die Expression von dem in der Literatur favorisierten Aktivierungsmarker CD69 lag erstaunlicherweise deutlich unter der von CD134 (Ox40). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden aufgrund dieser Experimente die Expression der Aktivierungsmarker CD25 (leichte Kette des IL-2 Rezeptors) und Ox40 (aktivierte T-Zellen) bei PBMC oben beschriebener Probandengruppen nach

Stimulation näher analysiert. Die angewendete Inkubationszeit wurde aus Kinetikversuchen von PBMC nach Stimulation mit verschiedenen GAD65 Peptiden und Tetanus Toxoid übernommen [57].

3.2.3 Optimierung des Nachweises antigenspezifischer T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Die Limitation des Nachweises autoreaktiver T-Zellen im peripheren Blut beruht stets auf der sehr geringen Frequenz dieser Zellen. Um die Population der autoreaktiven T-Zellen anzureichern, wurde nur eine Subpopulation, in der die autoreaktiven T-Zellen vermutet wurden, analysiert. In Abb. 33 ist beispielhaft dargestellt, durch welche Methoden genau diese Population betrachtet werden konnte.

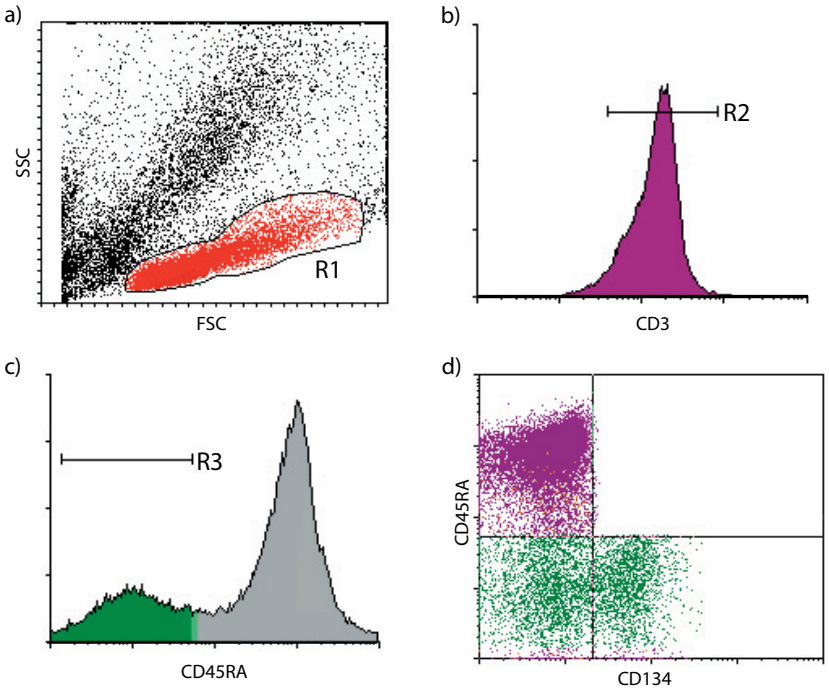


Abbildung 33: Auswertungskriterien zur Optimierung des Nachweises antigenspezifischer T-Zellen. a) Dot-Plot mit Forward-Side-Scatter (FSC-SSC). In Region R1 sind alle Lymphozyten eingegrenzt b) Histogramm-Plot mit Region R2, mit der die $CD3^+$ T-Zellen umfasst werden c) Histogramm-Plot mit Region R3, mit Hilfe derer die $CD45RA^+$ T-Zellen eingegrenzt werden können d) Dot-Plot von CD45RA und CD134. Rot = R1, Lila = R2, Grün = R3.

Im Forward-Sideward-Scatter Plot (Abb. 33a) wurde zunächst die Region der Lymphozyten eingegrenzt (R1; rot gefärbt). Somit gingen sehr große Zellen, wie z.B. Makrophagen, nicht weiter in die Analyse mit ein. In einem Histogramm-Plot, auf dem die Verteilung von CD3-positiven Zellen dargestellt war, konnten dann die CD3-positiven Zellen eingegrenzt werden (Abb. 33b; R2; lila). Wurden nun die Regionen eins und zwei verbunden (R1*R2), so wurden nur die $CD3^+$ Lymphozyten analysiert. In Abb. 34c ist ein weiterer Histogramm-Plot dargestellt, der die Verteilung der $CD45RA^+$ Zellen beschreibt. Die Region R3 umfasste die $CD45RA^-$ Zellen, welche den $CD45RO^+$ Zellen entsprechen. Mit Hilfe dieser Region konnte der Quadrant bei der Auswertung exakt so gelegt werden, dass in den unteren Abschnitten ausschließlich $CD45RA^-$ Zellen analysiert wurden. In Abb. 33d ist dies durch unterschiedliche Farben der Regionen dargestellt. Im Quadranten unten rechts befanden sich somit $CD3^+CD45RA^-CD134^+$, im Quadranten unten links $CD3^+CD45RA^-CD134^-$. In den oberen Abschnitten waren $CD3^+CD45RA^+$ T-Zellen dargestellt, die entweder CD134 (Ox40) positiv oder negativ sein konnten.

3.2.4 Einfluss der Co-Stimulation durch Zugabe des monoklonalen anti-CD28 Antikörpers auf die Detektion antigenspezifischer T-Zellen

Der Einsatz co-stimulatorischer Faktoren könnte bei der Untersuchung autoreaktiver T-Zellen sinnvoll sein, da diese Zellen aufgrund der anzunehmenden zahlreichen Restimulationen *in vivo* zumindest teilweise anerg sein könnten. Daher wurde der Einfluss von anti-CD28 an Hand der Expression von Ox40 (CD134) und CD25 nach Stimulation mit Tetanus Toxoid untersucht. Nach Untersuchung der PBMC von fünf Probanden kam es in keinem Fall zu einer positiven Auswirkung, das heißt zu keiner gesteigerten Ox40 (CD134) und CD25 Expression durch das Einsetzen von CD28 Antikörpern. Bei den untersuchten Probanden 3 und 5 wurde die Expression der beiden Aktivierungsmarker sogar gesenkt (Abb. 34a-b). Der Einsatz von CD28 Antikörpern als zusätzliches co-stimulatorisches Signal hatte bei allen dargestellten Fällen keine Auswirkung.

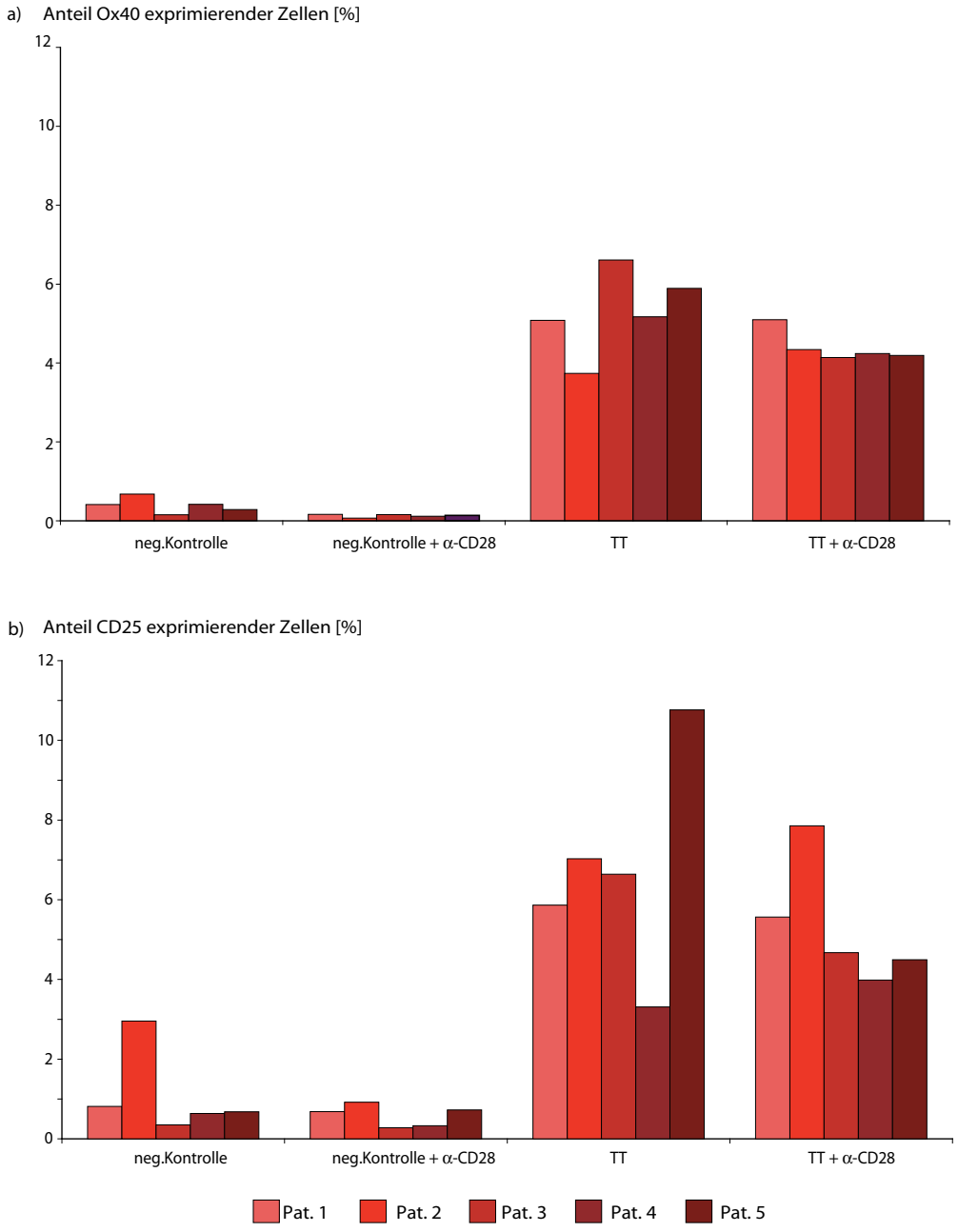


Abbildung 34: Einfluss von anti-CD28 Antikörpern auf die T-Zell Stimulation. Dargestellt ist der Prozentsatz an a) Ox40 (CD134) bzw. b) CD25 exprimierenden T-Zellen von 5 Probanden nach Inkubation der PBMC mit Medium (neg. Kontrolle) bzw. Tetanus Toxoid (TT) mit oder ohne anti-CD28 Antikörper (α-CD28).

3.2.5 Phänotypisierung antigenspezifischer Zellen

Nach den in Kapitel 3.2.3 und 2.4.3 dargelegten Kriterien wurden pro Proband 14-27 Datensätze erhoben. In Abbildung 35 ist dargestellt nach welchen Gesichtspunkten die Ergebnisse einer FACS-Messung analysiert wurden. Dabei konnten pro Analyse vier verschiedene Zellpopulationen, entsprechend der vier Quadranten (UL, UR, LL, LR), betrachtet werden.

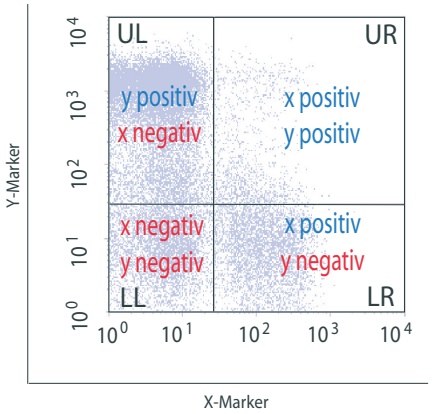


Abbildung 35: Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung. Dargestellt sind die durch Setzen eines Quadranten entstandenen vier Zellpopulationen. LL = lower right, LR = lower right, UL = upper left, UR = upper right.

In Abbildung 36 ist exemplarisch eine Auswertung bezüglich des Aktivierungsmarkers Ox40 (CD134) bzw. CD25 eines Patienten und einer Kontrolle nach Stimulation mit dem PPI-Peptid p10 (B16-32) und Tetanus Toxoid dargestellt.
Aus den Abbildungen ist zu erkennen, dass die durch einen Stimulus aktivierten T-Zellen in der $CD45RA^-$-Fraktion lagen und zusätzlich nach rechts gewandert waren (Quadrant LR). Dabei kam es bei den PBMC des T1D-Patienten nach Stimulation mit dem PPI-Peptid p10 im Gegensatz zur Mediumkontrolle (0,11 %) zu einer hochregulierten Ox40 Expression (1,76 %). Nach Stimulation mit der Positivkontrolle Tetanus Toxoid waren sowohl die PBMC des Patienten (4,98 %) als auch der Kontrollperson (9,1 %) durch eine hochregulierte Ox40 (CD134) Expression gekennzeichnet (Abb. 36a). Die Auswertung bezüglich des Aktivierungsmarkers CD25 (Abb. 36b) stellte sich auf gleiche Weise dar. Hierbei konnte jedoch eine positive CD25 Expression nach Stimulation mit Peptid p10 auch bei der Kontrollperson nachgewiesen werden. Für die Negativkontrolle und nach Stimulation mit Tetanus Toxoid ergaben sich vergleichbare Werte wie für die Analyse des Aktivierungsmarkers Ox40 (CD134).

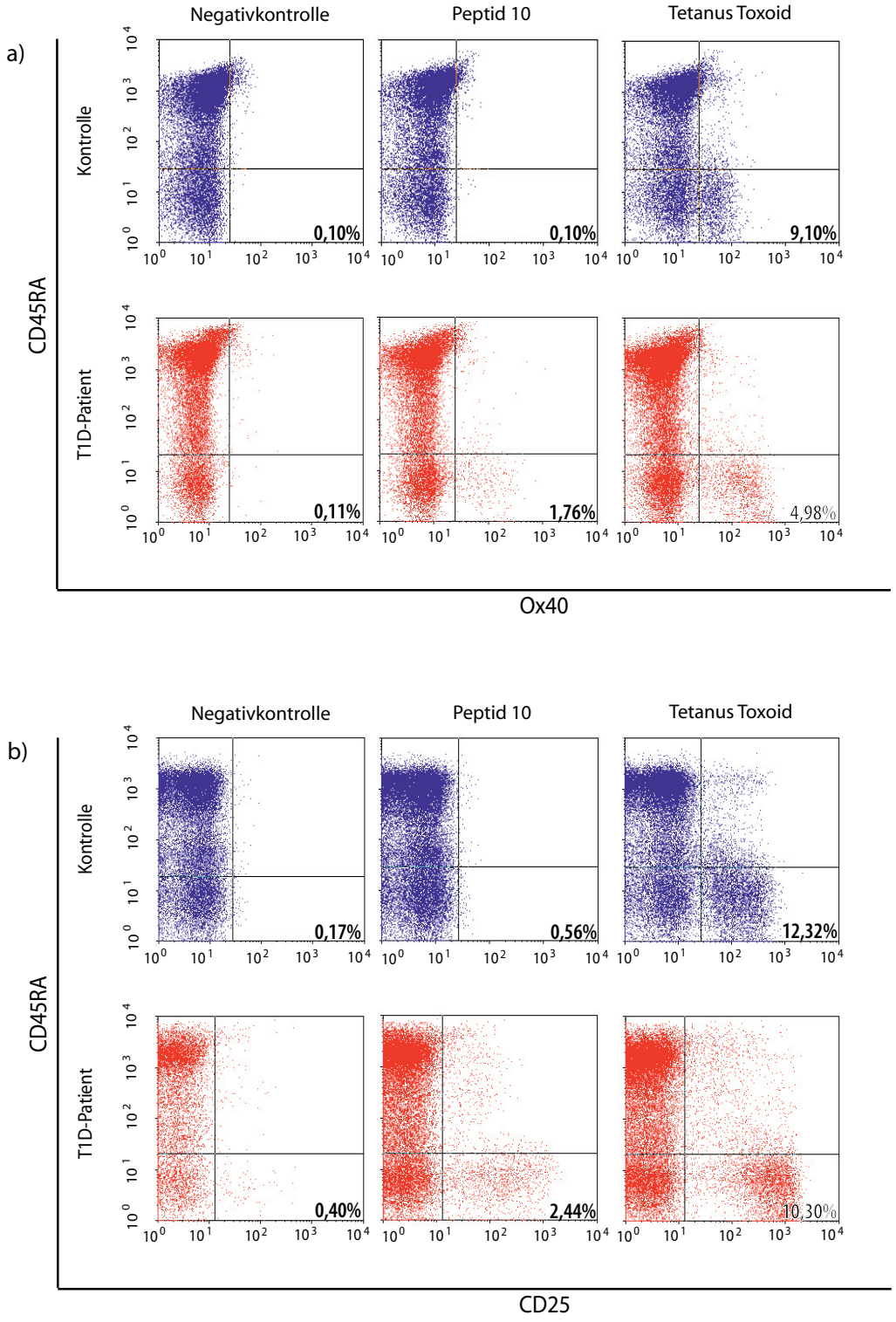


Abbildung 36: Phänotypisierung der antigenspezifischen T-Zellen. Dargestellt ist der Prozentsatz an a) Ox40 (CD134) bzw. b) CD25 exprimierenden T-Zellen eines T1D-Patienten und einer Kontrollperson nach Inkubation der peripheren Blutlymphozyten mit Medium (Negativkontrolle), PPI-Peptid p10 (B16-32) und Tetanus Toxoid.

3.2.6 Gesamtergebnisse: Kontrollpersonen vs. T1D-Patienten

Box-Plots für die Ox40 bzw. CD25 Expression

Die Analyse der Ox40 (CD134) und CD25 Expression ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollpersonen und T1D-Patienten bezüglich der Expression von CD25 ($p = 0{,}99$). Im Gegensatz dazu konnte eine Expression von Ox40 nur bei den analysierten PBMC von T1D-Patienten nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen T1D-Patienten und Kontrollpersonen bezüglich der Ox40 Expression war mit $p < 0{,}0001$ hochsignifikant. In Abbildung 37a ist die CD25 und Ox40 (CD134) Expression der beiden Gruppen in Form von Box-Plots dargestellt. Eine detaillierte Darstellung aller Stimulationsindizes findet sich in Tabelle A-10 und A-11 des Anhangs. Ein Einfluss der Diabetesdauer auf die Ox40 Expression konnte bei der Untersuchung der T1D-Subgruppen (T1D-EM vs. T1D>1J) nicht nachgewiesen werden (Abb. 37b).

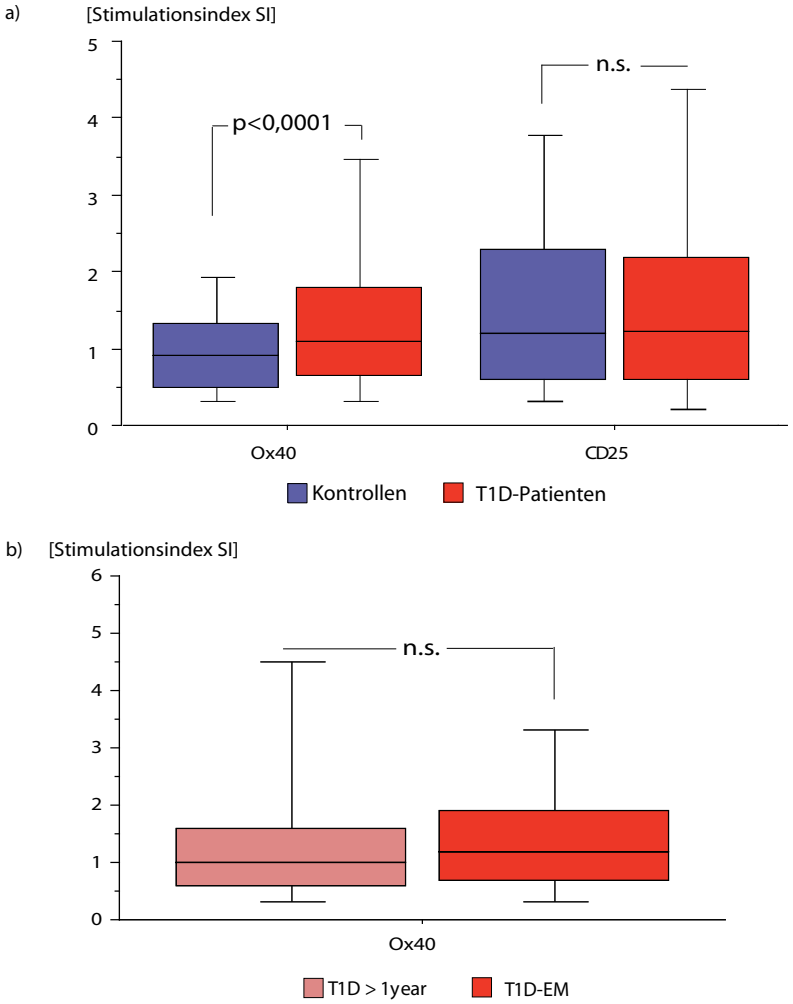


Abbildung 37: Analyse der Ox40 (CD134) und CD25 Expression der PBMC von a) Kontrollpersonen (n=12) im Vergleich zu Typ 1 Diabetes (T1D)-Patienten (n=24) b) erstmanifestierten T1D-Patienten (T1D-EM; n= 16) im Vergleich zu Langzeit-Patienten (T1D>1J; n=8). Signifikanzniveau: $p < 0{,}05$.

Anzahl der erkannten Peptide

Im Schnitt wurden bezüglich der, durch eine positive Hochregulierung von CD25 identifizierten Peptide, mehr als zwei PPI-Peptide sowohl von T1D-Patienten als auch von Kontrollpersonen erkannt. Bei der Analyse von Ox40 fand sich eine T-Zellerkennung von mehr als zwei PPI-Peptiden nur bei T1D-Patienten. Kein PPI-Peptid war jedoch in der Lage eine Ox40 Expression der PBMC von Kontrollpersonen zu induzieren. Lediglich die PBMC einer Kontrollperson ließen sich durch Peptid 16 und Peptid 17 zu einer positiven Ox40 Expression stimulieren (Tab. A-11 des Anhangs). In Abbildung 38 ist der Mittelwert der erkannten Peptide, bestimmt durch die Expression von CD25 bzw. Ox40, dargestellt.

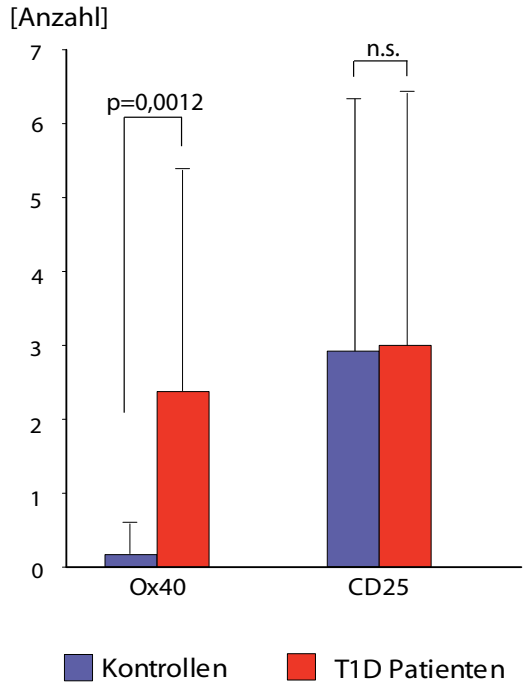


Abbildung 38: Anzahl der erkannten Peptide. Dargestellt ist die mittlere Anzahl an PPI-Peptiden ± der Standardabweichung, die bei PBMC von Kontrollpersonen bzw. Typ 1 Diabetes (T1D)-Patienten eine gesteigerte Ox40 (CD134) bzw. CD25 Expression induziert haben. Signifikanzniveau: $p < 0{,}05$; n.s. = nicht signifikant.

Prävalenz

Im Folgenden wurde die Prävalenz, das heißt der Anteil der Probanden, die gegen eines oder mehr der 21 PPI-Peptide bzw. der ganzen Antigene (Proinsulin, Insulin, B-Kette) reagierten, bestimmt. Es hat sich bei der Analyse der CD25 Expression gezeigt, dass die gesamten Antigene bzw. die PPI-Peptide von 60 % der Kontrollen und T1D-Patienten erkannt werden (Abb. 39).

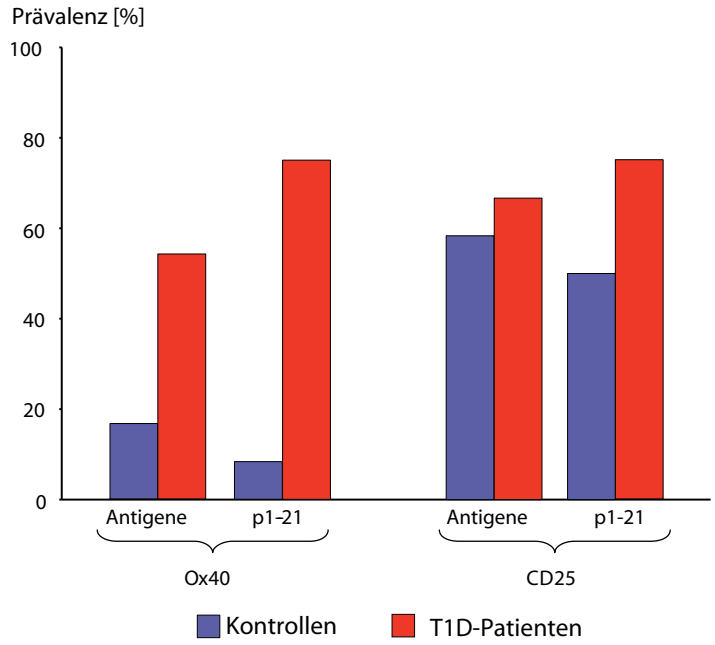


Abbildung 39: Dargestellt ist die Prävalenz, d.h. der Anteil an Probanden, bei der eine positive Ox40 (CD134) bzw. CD25 Expression der T-Zellen nach Stimulation mit den gesamten Antigenen (Proinsulin, Insulin, B-Kette) bzw. den 21 Präproinsulin-Peptiden (p1-21) induziert wurde.

Bei der Analyse der Ox40 Expression wurden die gesamten Antigene von 54 % der T1D-Patienten erkannt, während 75 % der T1D-Patienten die PPI-Peptide p1-21 erkannten. Die Prävalenz bei den Kontrollpersonen war sowohl bei den Antigenen (17 %) als auch bei den PPI-Peptiden (8 %) viel geringer (Abb. 39).

Frequenz

Bei der Analyse der von den T1D-Patienten erkannten Peptide konnte kein immundominantes Epitop identifiziert werden. Es zeigte sich, dass die Insulin B-Kette und das B-Ketten Peptid B16-32 (p10) am häufigsten von den T1D-Patienten erkannt wurden (Abb. 39). Alle Peptide, außer Peptid 13 (B30-C14), wurden von mindestens einem T1D-Patienten erkannt. In Abbildung 40 ist die Frequenz der hochregulierten Ox40 Expression nach Stimulation der PBMC mit den Antigenen Proinsulin, Insulin und der Insulin-B-Kette, sowie des PPI-Peptides B16-23, dargestellt.

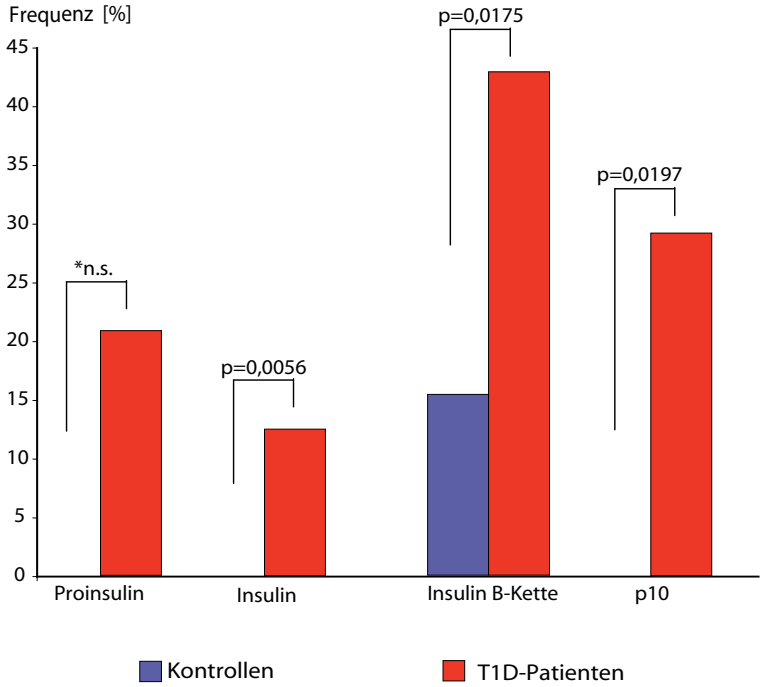
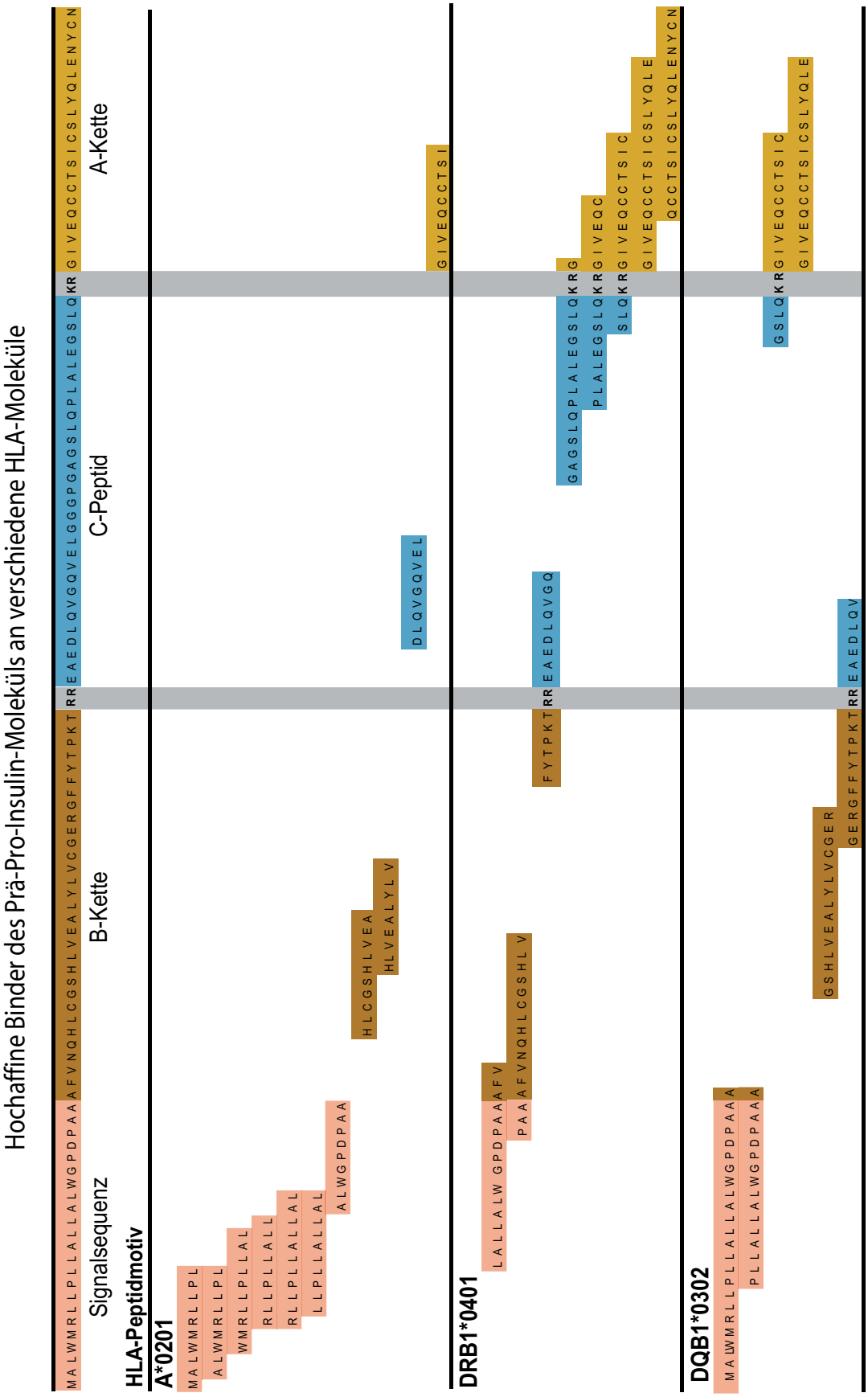


Abbildung 40: Frequenz der von den Typ 1 Diabetes (T1D)-Patienten am häufigsten erkannten Stimuli im Vergleich zu der Frequenz bei Kontrollpersonen. Signifikanzniveau: $p < 0{,}05$; n.s. = nicht signifikant.

Bindungsmöglichkeiten

Für jede Kombination von HLA-Allelen könnte es theoretisch verschiedene immunodominante Epitope des Autoantigens PräProInsulin geben. Für die Untersuchung, ob die von den Patienten erkannten Peptide überhaupt von den T1D-assoziierten HLA-Allelen präsentiert werden können, wurde zum einen in Zusammenarbeit mit *Prof. Stevanovic* (Universität Tübingen) zum andern über die Syfpeithi-Datenbank (www.Syfpeithi.de) eine computersimulierte Bindungsanalyse durchgeführt. Da die T1D-Patienten möglichst HLA-identisch sein sollten, wurden vor allem Patienten mit den HLA-Allelen DRB1*0401 und DQB1*0302 in die Studie aufgenommen (siehe Tabelle 2, Kapitel 2.1). Es zeigte sich, dass die Präsentation, der am häufigsten erkannten Peptide, theoretisch entweder durch HLA-DRB1*0401 oder HLA-DQB1*0302 möglich war. Durch die theoretisch ermittelten Bindungsaffinitäten (Tab. 23) ergab sich für das am häufigsten erkannten Peptides B16-32 (p10; 29 %) mit der Sequenz YLVCGERGFFYTPKTRR und des überlappenden Peptides B20-C4 (p11; 21 %) mit der Sequenz GERGFFYTPKTRREAED eine Bindung an HLA-DQB1*0302. Für die Peptide SS13-B4 (p4), SS21-B12 (p6), C13-29 (p16) und C18-A1 (p17), die von über 20 % der T1D-Patienten erkannt wurden, konnte eine theoretische Präsentation durch das HLA-Allel DRB1*0401 zugesprochen werden. Eine Beteiligung der T1D-assoziierten HLA-Klasse-I Allelen A*0201 an der Peptidpräsentation und demzufolge von CD8+ T-Zellen ist aufgrund der computersimulierten Bindungsaffinitäten aus Tabelle 24 nahezu auszuschließen.

Tabelle 24: Theoretisch ermittelte Bindungsaffinitäten von PräProInsulin Peptiden an die T1D-assoziierten HLA-A*0201, DRB1*0401 Allele. Die Bindungsaffinitäten für DQB1*0302 wurden aus der Literatur ermittelt [5, 65,].



3.2.7 Qualitätskontrollen der Populationsstudie

Korrelation zwischen CD25 und Ox40

Aus den Analysen der hochregulierten Aktivierungsmarker Ox40 (CD134) und CD25 nach Stimulation mit der Positivkontrolle Tetanus Toxoid, konnte eine stark positive Korrelation, mit einem Korrelationskoeffizienten von r = 0,883 zwischen den beiden Aktivierungsmarker nachgewiesen werden (Abb. 41).

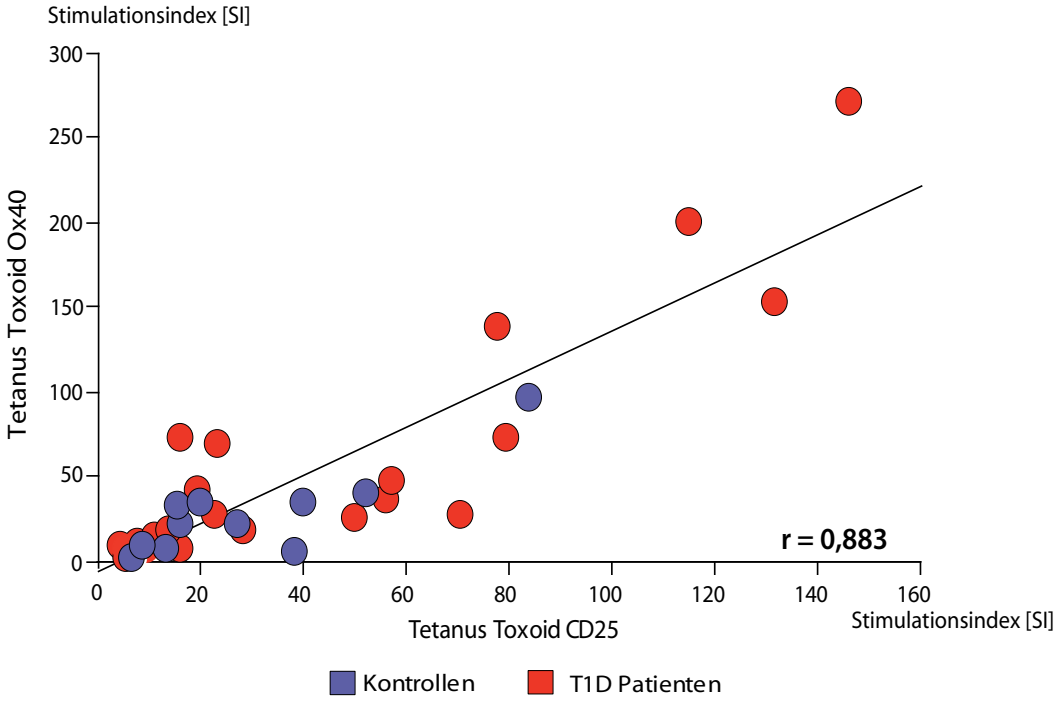


Abbildung 41: Korrelation zwischen den Aktivierungsmarkern Ox40 (CD134) und CD25 nach Stimulation mit Tetanus Toxoid. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Stimulationsindizes. r = Korrelationskoeffizient; T1D = Typ 1 Diabetes.

Positivkontrolle und Kontrollpeptid

Es hat sich gezeigt, dass bezüglich der Ox40 Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen T1D-Patienten und Kontrollpersonen nach Stimulation mit dem antisense Kontrollpeptid bzw. der Tetanus Toxoid Positivkontrolle nachzuweisen waren. Alle 36 untersuchten Probanden dieser Gruppen, mit Ausnahme von Proband Nr. 12 (siehe Anhang Tab. A-10), zeigten eine Ox40 Hochregulation nach Stimulation mit Tetanus Toxoid. Im Gegensatz dazu kam es, wie erwartet, in keiner Gruppe zu einer Stimulation durch das antisense Kontrollpeptid. In Abb. 42 sind die Box-Plots zu diesen Ergebnissen dargestellt.

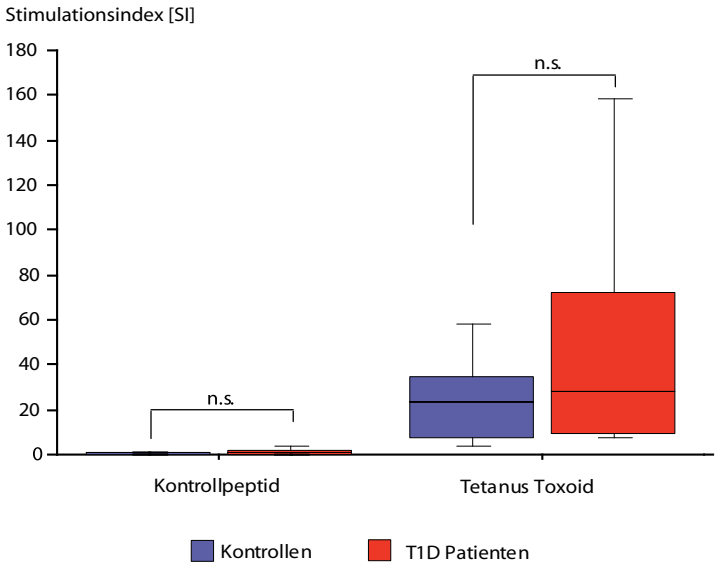


Abbildung 42: Ox40 Expression nach Inkubation mit dem antisense Kontrollpeptid bzw. mit Tetanus Toxoid bei Kontrollpersonen im Vergleich zu T1D-Patienten. Signifikanzniveau: $p < 0{,}05$; T1D = Typ 1 Diabetes; n.s. = nicht signifikant.

Sensitivität und Spezifität

Zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität der Ox40 (CD134) Expression, hinsichtlich der Sicherung der Diagnose eines stattfindenden Autoimmunprozesses, wurde die Summe aller erhobenen Stimulationsindizes jedes einzelnen Probanden herangezogen. In Abbildung 43 sind die Mittelwerte der Summen der Gruppen T1D und „nicht T1D" dargestellt. Als pathologischer Grenzwert wurde der Mittelwert der gesunden Probanden ($\Sigma = 22{,}5$) definiert.

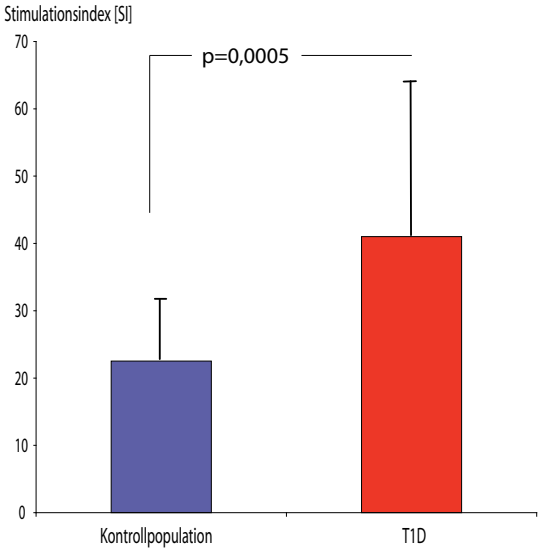


Abbildung 43: Im Schnitt bei den Typ 1 Diabetes-Patienten (T1D; n = 24) und der Kontrollpopulation (n = 16) erzielte Summe der Stimulationsindizes ± Standardabweichung bei der Analyse von Ox40. Signifikanzniveau: $p < 0{,}05$.

Die Analyse der Daten ergab bezüglich des definierten Grenzwertes folgende Verteilung in einer Vierfeldertafel (Abb. 44):

		VORHERGESAGT: KRANK	VORHERGESAGT: GESUND
BEOBACHTET	KRANK	20 Personen	4 Personen
	GESUND	8 Personen	8 Personen

Abbildung 44: Vierfeldertafel entsprechend des definierten pathologischen Grenzwertes ($\Sigma_{SI} = 22{,}5$) für eine bestehende Autoimmunreaktion. Σ_{SI} = mittlere Summe der Stimulationsindizes (der Kontrollgruppe).

Aufgrund der Ergebnisse der Vierfeldertafel konnte für die Beurteilung des Grenzwertes 22,5 eine Sensitivität von 0,83 und eine Spezifität von 0,5 errechnet werden. Um diesen Grenzwert als Schwelle zur Identifikation eines Probanden mit einer T1D-assoziierten Autoimmunreaktion weiter zu bestätigen, wurde eine ROC-Kurve analysiert.

ROC-Analyse

Die ROC-Kurve („Receiver Operating Characteristic“) stellt die Sensitivität gegen den Komplementärwert der Spezifität dar. So ist eine Bewertung der Vorhersagekraft durch die Analyse des Zusammenwirkens von Sensitivität und Spezifität möglich. Eine Kurve entsprechend einer Winkelhalbierenden von 45° entspricht hierbei einem diagnostischen Wert ohne Vorhersagekraft. Ein Maß für die Vorhersagekraft eines Tests ist die Fläche unter der Kurve, die mit zunehmender „Bauchigkeit“ der Kurve steigt. Der Maximalwert würde 1 und bei fehlender Vorhersagekraft 0,5 betragen. Die optimale Kombination aus Sensitivität und Spezifität wurde durch Verschieben der Winkelhalbierenden bis zum äußersten Schnittpunkt mit der Kurve ermittelt (Abb. 45; in der Grafik grün aufgetragen).

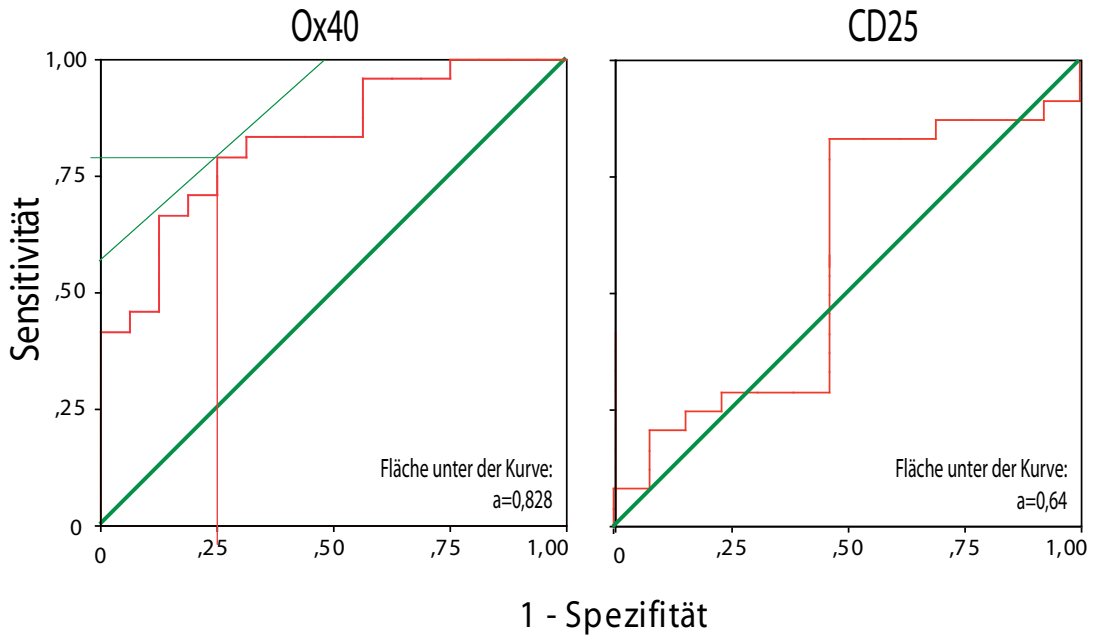


Abbildung 45: Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve für den Aktivierungsmarker a) Ox40 bzw. b) CD25, die mittels der Summen der Stimulationsindizes bei Typ 1 Diabetes-Patienten (n = 24) und der Kontrollpopulation (n = 16) bestimmt wurde.

Für die Erstellung einer ROC-Kurve bezüglich der Analyse von Ox40 bzw. CD25, wurde die Summe aus allen erhaltenen Datensätzen jedes Probanden, mit Ausnahme von Negativkontrolle, Kontrollpeptid und Tetanus Toxoid, in die Analyse aufgenommen. Für den Aktivierungsmarker Ox40 betrug die Fläche unter der Kurve 0,828 mit einem 95 %-Vertrauensintervall von 0,702 bis 0,955. Im Schnitt ergab sich bei der Kontrollpopulation eine Summe der Stimulationsindizes von ∑ = 22,5. Die ROC-Analyse lieferte einen Schwellenwert von 26,78. Dieser ermittelte Grenzwert ergab eine um 4,1 Punkte niedrigere Sensitivität (79,2 %) als bei der Vierfelder-Tafel. Jedoch ergab sich daraus eine um 25 Punkte auf 75 % gestiegenen Spezifität. Eine gesunde Kontrollperson wurde damit durch diesen Test zu 75 % als richtig gesund eingestuft. Im Schnitt ergab sich für die T1D-Patienten eine Summe der Stimulationsindizes von ∑ = 41 (siehe Abb. 42). Mit einer Summe von ∑ = 41 konnte ein Patient zu 100 % als krank identifiziert werden. Für den Aktivierungsmarker CD25 konnte keine Aussage getroffen werden, da die Fläche unterhalb der ROC-Kurve mit 0,64 zu niedrig war.
Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Betrachtung der Hochregulierung des Aktivierungsmarkers Ox40 eine gute diagnostische Aussage in der untersuchten Gruppe hinsichtlich der Identifizierung autoreaktiver T-Zellen bei Typ 1 Diabetes hatte.

Beurteilung der Doppelwerte

Es hat sich gezeigt, dass die Differenzen zwischen den Doppelwerten nicht stark von einander abwichen. Bei der Analyse von Ox40 ergaben sich im Median Differenzen der Doppelwerte von 0,04 % (Interquartilrange (IQR) = 0,09). Wobei eine minimale Differenz von 0,000% und eine maximale von 2,04 % erzielt wurde. Für die Analyse der CD25 Messungen ergab sich ein Median von 0,1 (IQR = 0,199) bei einem Minimum von 0,000 % und einem Maximum von 4,19 %.

3.2.8 Beschreibung der Autoantikörper positiven Probanden

Die Gruppe der Ak+ Probanden umfasste drei Personen, die nach Identifizierung von erhöhten Autoantikörper-Titern ein gesteigertes Risiko besaßen, an T1D zu erkranken (siehe Tab. 2 Kapitel 2.1). Der Antikörperstatus von Ak+ Proband 41 zeigte bei allen vier untersuchten Autoantikörpern einen stark über dem Cut-Off liegenden Titer. Hinsichtlich der Expression von Ox40 (CD134) konnte eine positive Expression durch 8 Stimuli (Antigen, PPI-Peptide) induziert werden (siehe Tabelle 24). Der Proband 42 wies ebenfalls einen erhöhten Antikörper Titer von allen untersuchten Autoantikörpern auf. Hier konnte nur durch Peptid 16 (C13-29) eine Aktivierung der T-Zellen erzielt werden. Der Proband 43 war durch einen sehr hohen Titer von Insulin-Antikörpern (IAA) charakterisiert. Die anderen untersuchten Autoantikörper-Titer waren negativ (siehe Tab. 2). Die T-Zellen dieses Probanden ließen sich durch die Peptide der Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und A-Kette (p16-18) induzieren. Insgesamt konnten bei den PBMC aller drei Ak+ Probanden Reaktivitäten gegen die Verbindungssequenz von C-Peptid und A-Kette nachgewiesen werden. Die pro Proband berechnete Summe der Stimulationsindizes, die aus allen eingesetzten Stimuli, außer der Negativkontrolle, des Kontrollpeptides und Tetanus Toxoid, berechnet wurde, ergab für Proband 41 $\Sigma = 78{,}5$, für Proband 42 $\Sigma = 19{,}3$ und für Proband 43 $\Sigma = 45{,}1$. Bezüglich der ROC-Kurve aus Kapitel 3.2.7 wären die Probanden 41 und 43 sicher in die Gruppe der Probanden, bei denen eine Autoimmunreaktion abläuft, eingeteilt worden.

Tabelle 25: Ox40 (CD134) Expression nach Stimulation der peripheren Blutlymphozten von drei autoantikörperpositiven (Ak+) Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulationsindizes (SI). Ein SI ≥ 3 (orange) wurde als positiv gewertet. p = Peptid; TT = Tetanus Toxoid.

Ox40-Expression [SI]		***Prädiabetiker***	
Antigen	***41***	***42***	***43***
Proinsulin	**9,3**	1,1	1,4
Insulin	**3,6**	0,5	1,3
Insulin B-Kette	**7,4**	1,0	2,4
p1	0,7	0,4	1,3
p2	1,1	0,7	1,3
p3	**4,1**	0,5	2,1
p4	1,3	0,1	0,1
p5	0,3	0,1	0,1
p6	1,7	0,2	0,2
p7	2,6	0,8	1,5
p8	1,9	0,3	1,9
p9	**9,8**	0,3	1,9
p10	**5,9**	1,1	2,3
p11	2,3	0,9	2,3
p12	**4,6**	0,7	2,3
p13	2,4	1,0	1,5
p14	1,6	0,6	1,9
p15	1,9	0,8	2,0
p16	1,8	**3,0**	**3,0**
p17	**5,1**	0,9	**3,8**
p18	1,8	1,3	**3,0**
p19	**4,2**	0,7	2,4
p20	1,6	0,8	2,5
p21	1,5	1,6	2,5
TT	**26,6**	**15,5**	**15,5**

3.2.9 Beschreibung der T2D-Patienten

Die Gruppe der T2D-Patienten umfasste vier Probanden (Nr. 37-40), die keine autoimmune Grundlage des Diabetes aufwiesen (siehe Tabelle 2 Kapitel 2.1). Hinsichtlich der Analyse der Ox40 Expression war kein Stimulus in der Lage die T-Zellen der Probanden zu aktivieren (Tab. 26). Bezüglich der ROC-Kurve konnten alle Probanden in die Gruppe der Probanden, die keine Autoimmunreaktionen aufweisen eingeteilt werden, obwohl durch eine längere Insulinbehandlung eine dauerhafte „Impfung" mit einem Antigen erfolgte

Tabelle 26: Ox40 (CD134) Expression nach Stimulation der peripheren Blutlymphozten von den vier T2D-Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulationsindizes (SI). SI ≥ 3 (grün) wurde als positiv gewertet. p = Peptid; TT = Tetanus Toxoid

Ox40 Expression [SI]			***T2D***	
Antigen	***37***	***38***	***39***	***40***
Proinsulin	0,9	0,6	2,1	1,4
Insulin	0,6	0,6	0,6	0,4
Insulin B-Kette	0,2	1,4	1,6	0,8
p1	1,0	0,6	1,0	0,7
p2	0,2	0,5	0,9	0,6
p3	0,7	0,6	0,8	0,8
p4	0,8	0,7	0,9	1,0
p5	0,8	0,5	0,9	0,5
p6	0,8	0,9	0,6	0,3
p7	0,9	0,6	1,4	0,3
p8	0,6	0,7	0,8	0,4
p9	0,6	0,6	0,6	0,3
p10	0,8	0,6	0,7	0,6
p11	0,4	0,7	2,8	0,6
p12	0,2	0,5	0,8	0,8
p13	1,1	0,5	0,9	0,7
p14	1,0	1,8	0,8	0,6
p15	0,4	0,5	0,5	0,4
p16	0,9	0,5	0,8	0,6
p17	1,0	0,7	0,6	0,3
p18	1,2	0,7	0,6	0,3
p19	0,9	0,5	0,4	0,8
p20	1,0	0,6	0,8	0,5
p21	1,0	0,6	0,5	0,1
TT	0,7	0,7	**38,8**	**10,6**

4 Diskussion

Organspezifische Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Typ 1 Diabetes, sind gekennzeichnet durch eine T-zelluläre Infiltration der betroffenen Organe, das Auftreten organspezifischer Autoantikörper, eine genetische Prädisposition und das Auftreten weiterer organspezifischer Erkrankungen. Klar ist, dass der Phänotyp durch T-Lymphozyten übertragen werden kann. Deshalb ist die Identifizierung der autoreaktiven Zellen und auch die Aufklärung der Mechanismen, die zur Aktivierung dieser Zellen führen, für eine frühzeitige Diagnose und somit auch für die Prävention von entscheidender Bedeutung sind.

In der vorliegenden Studie konnten Mechanismen für eine Aktivierung proinsulinspezifischer autoreaktiver T-Zellen anhand einer detaillierten Analyse putativ autoreaktiver Zellen auf Ebene von T-Zell-Linien analysiert werden. Zum anderen wurde eine Querschnittstudie an definierten Kohorten zur Identifizierung autoreaktiver T-Zellen durchgeführt.

4.1 T-Zell-Linien

4.1.1 Zusammenfassung

Insgesamt konnten zwei HLA-DRB1*0401 restringierte T-Zell-Linien, SD32.5 und SD52c1, generiert werden. In Abbildung 46 ist die Sequenz der beiden identifizierten immunogenen Epitope, gegen die die beiden Linien spezifisch reagierten, dagestellt.

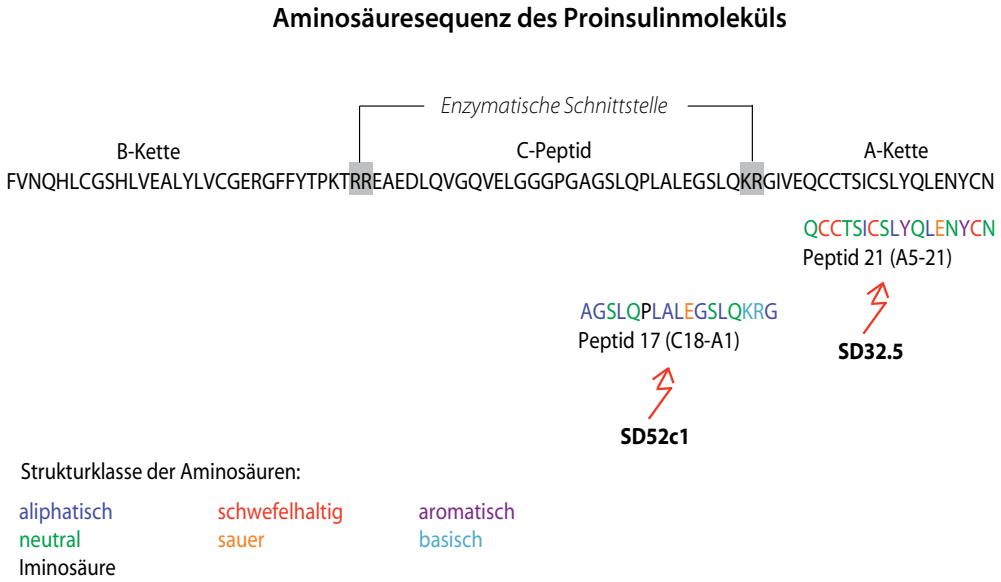


Abbildung 46: Aminosäuresequenz des Proinsulin Moleküls und die Lage der immunogenen Peptide, gegen die die Reaktion der T-Zell-Linien SD32.5 bzw. SD52c1 gerichtet war.

Bei Linie SD32.5 handelte es sich um eine Linie, die spezifisch für das sehr cysteinhaltige Ende der A-Kette (A5-21) war. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Linie durch einen eher Th1 Phänotyp gekennzeichnet war. Mit der Linie SD32.5 konnte eine insulinspezifische Linie generiert werden, deren Spezifität nicht nur durch den stattfindenden Autoimmunprozess, sondern auch durch die exogene Insulin-Applikation, die zum Zeitpunkt der Untersuchung drei Monate andauerte, induziert sein könnte.

Im Gegensatz dazu konnten die Zellen der generierten T-Zell-Linie SD52c1 als proinsulinspezifisch bezeichnet werden. Dieser Klon war durch ein Tho-Zytokinprofil mit einer dominanten IL-5 und IFNγ Sekretion gekennzeichnet. Das identifizierte immunogene Peptid, waren vor allem durch die Beteiligung der Aminosäuren der Verbindungsse-

quenz zwischen C-Peptid und A-Kette gekennzeichnet. Die letzten drei Aminosäuren des durch die Linie SD52c1 identifizierten immunogenen Proinsulin-Peptides C18-A1 AGSLQPLALEGSLQKRG beinhalt die Aminosäuren, die bei der Spaltung des Proinsulins in Insulin beteiligt sind. Dabei stellt die letzte Aminosäure – Glycin - die Stelle dar, an der die Spaltung durch die Prohormon Convertase II erfolgt [39]. Die beiden Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) werden *in vivo* durch die Carboxypeptidase H abgespalten [39]. Die durch Alanin-Scan-Peptide identifizierten Ankerpunkte, die für die Aktivierung der Zellen dieser Linie essentiell waren (PLALEGSLQK) existieren bei der „normalen" Prozessierung also nur als ein kurzlebiges Zwischenprodukt in den β-Zellen während der Reifung von Insulin (Abb. 47).

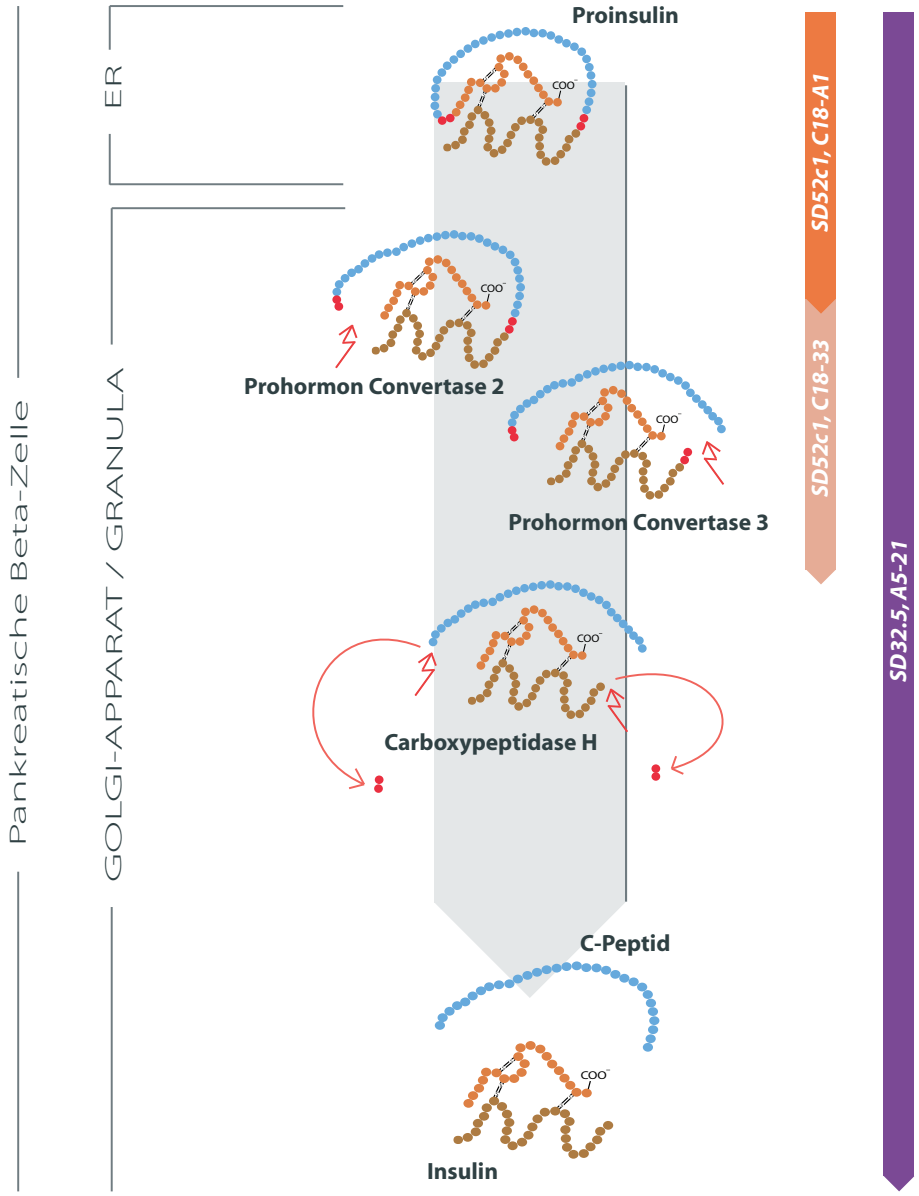


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Insulin-Biosynthese und des Zeitpunktes an dem die durch die Linien SD32.5 bzw. SD52c1 identifizierten imunogenen Peptide A5-21 bzw. C18-A1 entstehen können. braun: Insulin-B-Kette; blau: Proinsulin-C-Peptid; orange: Insulin-A-Kette; rot: enzymatische Schnittstellen; S=S: Disulfidbrücken; ER = Endoplasmatisches Retikulum

Daher bestand kein Zweifel, dass diese T-Zell-Linie eine T1D-assoziierte Linie war, deren Zellen *in vivo* bei der Prozessierung des Hormons Insulin geprimed wurden und dass die Spezifität dieser Linie nicht durch die exogene Insulin-Applikation induziert werden konnte. Außerdem konnte hier die natürliche Prozessierung dieses Peptides aus dem Proinsulin-Molekül nachgewiesen werden.

4.1.2 Zytokinmuster verschiedener Zell-Populationen

Aus den isolierten peripheren Blutlymphozyten eines Patienten wurde zunächst eine Zytokinanalyse durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Zellpopulationen (PBMC, $CD4^+CD45RA^+$ und $CD4^+CD45RA^-$) im Kurzzeit-Test mit Proinsulin (PI), Insulin (I), Insulin A- und B-Kette und 21 überlappende Peptiden stimuliert (siehe Kapitel 2.2.3).
Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation sowohl der PBMC als auch der untersuchten T-Zell-Subpopulationen mit verschiedenen Präproinsulin Präparaten vor allem eine Th1-Antwort induzierte, die durch eine klare Dominanz des inflammatorischen Zytokins IFNγ charakterisiert war. Die verschiedenen Subpopulationen konnten durch die Peptide der PPI-Signalsequenz (Peptid p3 und p4), der Insulin A-Kette (Peptid p19 und p20), vor allem aber gegen Peptide der Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und Insulin A-Kette (Peptid p17 und p18) aktiviert werden.
Th1-Zellen sind durch die Produktion von IFNγ gekennzeichnet. Sie vermitteln die zellulären inflammatorischen Immunantworten. Im Gegensatz dazu produzieren Th2 Zellen große Mengen an IL-4, IL-5 und IL-10 und sind vor allem bei Allergien nachweisbar [113, 145]. So führt eine Disbalance der von Th1- und Th2-Zellen sezernierten Zytokine zu einer Ausbildung einer pathogenen Reaktion [146, 159]. Das Gleichgewicht von Th1 zu Th2 hat sich bei den in diesem Versuch untersuchten Zellsubpopulationen deutlich in Richtung Th1 verschoben. Daher ist zum Zeitpunkt der Analyse primär von einer inflammatorischen Immunantwort auszugehen.
Eine Aktivierung der Zellen der untersuchten Zell-Populationen durch das komplette Antigenmolekül (Insulin und Proinsulin) war nicht zu detektieren. Diese Tatsache wurde schon von *Durinovic-Belló* und *Ellis* beschrieben, die in Proliferationsanalysen ebenfalls keine detektierbaren Reaktionen gegen Proinsulin und Insulin in verschiedenen T-Zell-Subpopulationen bei T1D-Patienten nachweisen konnten [54, 55].

4.1.3 Etablierung spezifischer T-Zell-Linien

Wie oben bereits dargelegt, konnten zwei epitopspezifische T-Zell-Linien (SD32.5 und SD52c1) generiert werden. Linie SD32.5 war spezifisch gegen ein Epitop, das sich am Ende der Insulin A-Kette, A5-21, befindet. Im Falle der Linie SD52c1 konnte eine Spezifität gegen das PPI-Peptid C18-A1, das am Ende des C-Peptides beginnt und bis in die A-Kette reicht, nachgewiesen werden. Auch aus früheren Untersuchungen der Memory-T-Zell Antwort gegen überlappende Peptide des Präproinsulins, zeigten gesunde Kinder und Kinder mit nur einem Autoantikörper (geringes T1D Risiko) eine überwiegende Reaktion gegen diese zwei Epitope [54].
Für die Selektion der Peptide, mit denen die T-Zell-Linien generiert werden sollten, wurden die von Geluk beschriebenen Bindungsaffinitäten verschiedener Proinsulinpeptide [63] berücksichtigt. Eine weitere Selektion der für die Generierung von T-Zell-Linien in Frage kommenden Zellen wurde aus dem oben beschriebenen initialen Kurzzeit-Versuch ermittelt.
Die Charakterisierung von autoreaktiven T-Zellen durch Generierung von T-Zell-Linien wird kontrovers diskutiert. Zum einen können die T-Zellen durch die Langzeit-Bedingungen *in vitro* modifiziert werden. Jedoch ist eine genaue Charakterisierung dieser T-Zellen, die eine gewisse Menge an gleichartigen Zellen erfordert, ohne diese Methode nicht möglich. Die hier angewendete Methode zur Generierung von T-Zell-Linien basierte auf wiederholten Restimulationszyklen für die Selektion von spezifischen T-Zellen und einer Expansionsphase in der IL-2 zugeführt wurde. Derzeit gibt es mehrere Publikationen, in denen eine Methode zur Charakterisierung von T-Zellen angewendet wird, die einen Kompromiss zwischen *ex vivo* Versuch und Langzeit-Kulturen darstellen. Hierbei handelt es sich um die Generierung von sogenannten Kurzzeit-Linien. Hierbei werden PBMC zunächst für 7-10 Tage mit einem Antigen stimuliert. Anschließend erfolgt der erste Restimulationsschritt. Jedoch wird im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Vorgehensweise nun sofort IL-2 hinzugefügt [5]. Dabei ist die Ausbeute an spezifischen T-Zell-Linien sehr hoch. In der vorliegenden Studie konnte aber nachgewiesen werden, dass die gleichzeitige Anwesenheit von IL-2 und Antigen vor allem bei der ersten Restimulation zu unspezifischem Wachstum der Linie führen konnte. Außerdem kam es durch eine Restimulation an einem zu frühen Zeitpunkt zu einer Apoptose der T-Zellen, wobei die T-Zell-Linie verloren ging. *Hesse* beschreibt hierzu in einer früheren Studie die Avidität eines T-Zell-Klons als eine Funktion des Aktivierungszustandes [73]. Sie konnte nachweisen, dass sich die Schwelle für eine Aktivierung und somit auch die Funktionalität der T-

Zelle in zyklischen Abständen verändert. Dies ist eine Funktion der Zeit nach Antigenstimulation. Entsprechend der Literatur wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Restimulationszeit von 14 Tagen eingehalten [72, 131].

4.1.4 Spezifität der T-Zell-Linien

Bei beiden Linien zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der Proliferation und auch der Zytokinsekretion. Daher ist von einem zur Signalstärke, d.h. der Konzentration des eingestezten Peptides, proportionalen Anstieg auszugehen. Die Affinität der beiden Linien zu ihrem stimulierenden Peptid war sehr hoch. Bei Linie SD32.5 konnte schon nach Zugabe von 0,1 µg/ml Peptid (A5-21) eine positive Stimulation nachgewiesen werden. Es konnte also vermutet werden, dass eine Stimulation auch noch durch eine geringere Konzentration an Peptid A5-21 zu einer positiven Aktivierung führen würde. Die Linie SD52c1 war weniger affin. Sie zeigte erst bei einer eingesetzten Peptidkonzentration von 0,5 µg/ml eine positive Reaktion. Die Konzentration, bei der die halbmaximale Proliferation erreicht wurde, war bei beiden Linien jedoch gleich.
Die in dieser Studie generierten Linien zeichneten sich auch durch ihr spezifisches Zytokinprofil aus. Während bei Linie SD32.5 von Anfang an IFNγ das dominante Zytokin war, sezernierte SD52c1 vor allem Interleukin (IL)-5. Bei SD32.5 zeigte sich ebenfalls eine hohe Sekretion von IL-5, jedoch war diese quantitativ weitaus geringer als die Sekretion von IFNγ. Eine IL-10 Sekretion konnte bei beiden T-Zell-Linien nicht nachgewiesen werden. Im ELISA galt dies auch für IL-4. Lediglich bei der intrazellulären Färbung bei SD32.5 konnte bei einigen T-Zellen eine IL-4 Sekretion nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es sich bei SD32.5 eher um eine Th1-Linie handelt, da IFNγ das dominante Zytokin war. Das Zytokinprofil von SD52c1 entspricht eher einem Tho-Profil. Nach den ersten Restimulationen zeigte sich bei Linie SD52 noch ein Th2–Muster mit einer dominanten IL-5 Sekretion aber keiner nachweisbaren IFNγ-Sekretion. Der Verlust dieses Musters ist vor allem auf die Kulturbedingungen zurückzuführen. Dabei wurde durch IL-2 Zugabe ein Th1-Milieu geschaffen. Die meisten in der Literatur beschriebenen diabetogenen T-Zell-Klone sind durch einen Th1 oder Tho Phänotyp gekennzeichnet, wobei die Zytokine IFNγ, TNFα, IL-2 und manchmal auch IL-4 sezerniert werden [71, 183]. Für die Entwicklung von Immuntherapien wäre es interessant zu versuchen, diese etablierten Th1-Klone *in vitro* in Th2-sezernierende Zellen zu modifizieren. Idealerweise könnten so zerstörerische

inflammatorische Th1 Zellen in schützende regulatorische Zellen umgewandelt werden, die dann vielleicht eine Diabetes Entwicklung verhindern könnten.

4.1.5 Natürlich prozessierte Epitope

Eine Prozessierung und Präsentation der Peptide aus dem gesamten Proinsulin-Molekül durch autologe PBMC konnte nicht nachgewiesen werden. Durch die Verwendung angereicherter HLA-identischer dendritischer Zellen (DC) als antigenpräsentierende Zellen konnte jedoch ein anderes Ergebnis erzielt werden. Dabei zeigte sich, dass sowohl das SD32.5 stimulierende Peptid A5-21 als auch das SD52c1 stimulierende Peptid C18-A-1 tatsächlich aus dem Proinsulin-Molekül prozessiert werden konnten. Im peripheren Blut sind dendritische Zellen in einer sehr geringen Frequenz zu finden. Da jedoch auch B-Zellen und Makrophagen als professionelle antigenpräsentierende Zellen gelten, sollten auch PBMC die beiden Peptide in ausreichender Menge prozessieren und präsentieren können. Aus den voliegenden Ergebnissen kann jedoch geschlossen werden, dass ausschließlich die dendritischen Zellen, zumindest im Kontext Autoimmunität, an der Präsentation immunogener Peptide beteiligt sind. Dendritische Zellen gelten als Wächter des Immunsystems, die Antigene abfangen und prozessieren, costimulatorische Moleküle für die Lymphozyten Aktivierung tragen, in die lymphatischen Organe einwandern und Zytokine sezernieren, um die Immunantwort in Gang zu bringen [16]. In der Literatur gelten sie daher als die potentesten antigenpräsentierenden Zellen [61]. Die Anzahl der Peptid präsentierenden professionellen APC, d.h. der dendritischen Zellen, in den peripheren Blutlymphozyten ist somit wahrscheinlich viel zu gering. Da auch mehrere Epitope aus dem Proinsulin prozessiert werden, ist die Konzentration der für die Aktivierung der Linien benötigten Peptide ebenfalls zu gering. Der Mangel an dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen im peripheren Blut könnte auch die Erklärung dafür sein, dass die durch Proliferations-Assays gemessenen Reaktivitäten gegen verschiedene Antigene bei vielen Studien nicht zu detektieren waren [48, 148, 153].

4.1.6 Restriktionsanalyse

Inhibition durch anti-HLA-DR und -DQ

Der HLA-Haplotyp des untersuchten Patienten war durch die T1D-assoziierten HLA-Allele DRB1*0401 und DQB1*0302 (DQ8) charakterisiert. Die Untersuchung des Restriktionselementes ergab, dass sowohl SD32.5 als auch SD52c1 nicht durch HLA-DQ sonderen durch HLA-DR restringiert waren. Für die Diabetessuszeptibiltät ist vor allem die Expression verschiedener HLA-Allele von Bedeutung. Dabei ist der Haplotyp HLA-DR3/4 zusammen mit HLA-DQ2/8 der mit dem höchsten T1D-Risiko [40, 121]. Die stärkste Assoziation wird jedoch durch die Aminosäure-Position 57 der HLA-DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) B-Kette determiniert. Eine Asparaginsäure an dieser Position wirkt protektiv [187]. Demgegenüber erhöht ein neutraler Aminosäurerest, wie z.B. Alanin, Serin oder Valin, das Risiko für Diabetes. Dabei führt dieser neutrale Aminosäurerest zu einer positiven Ladung der für die Peptidbindung wichtigen Tasche P9 [99]. Diese Nicht-Asparaginsäure an Position 57 des DQ8-Alleles wird demzufolge mit einem gesteigerten T1D-Risiko assoziiert.

Es zeigte sich jedoch, dass keine der etablierten Linien HLA-DQ restringiert war. Dies könnte bedeuten, dass HLA-DR das Molekül ist, das an der direkten Epitoppräsentation beteiligt ist. Die HLA-DQ kodierten Moleküle würden somit die Interaktion der Effektorzellen mit den zu zerstörenden pankreatischen β-Zellen auf eine andere Weise beeinflussen. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass das T1D-Risiko für das HLA-Allel DR4 relativ gering ist. Jedoch wird durch eine parallele Expression bestimmter DQ-Allele das Risiko in der Art moduliert, dass die T1D-Suszeptibilität steigt. Demnach ist das Vorhandensein von DRB1*0401 zusammen mit DQB1*0302 bzw. DRB1*0301 zusammen mit DQB1*0201 erforderlich.

Spezifische HLA-Restriktion

Bei der detailierten Analyse des Restriktionselementes konnte für die Linie SD32.5 das HLA-DRB1*0401 Molekül definiert werden. Aufgrund dessen, dass der hier untersuchte Patient homozygot für HLA-DRB1*0401 war und weil *Undlien* dieses HLA-Molekül als das am stärksten T1D-assoziierte HLA-DR4-Allel [174] definierte, war die identifizierung von HLA-DRB1*0401 ein erwartetes Ergebnis.

Die Analyse des Restriktionselementes von SD52c1 hingegen lieferte uns keine eindeutigen Ergebnisse. Nachdem das HLA-DR-Molekül im Inhibitionstest mit monoklona-

len Antikörpern gegen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-Klasse-I als Restriktionselement ermittelt werden konnte, wäre auch hier zu erwarten, dass die Antigenpräsentation des HLA-DRB1*0401 homozygoten Patienten wie bei der Linie SD32.5 durch DRB1*0401 erfolgte. In Teilen konnte dies auch nachgewiesen werden, wobei sich eine dominante Peptidpräsentation durch HLA-DRB1*0401 zeigte. Dabei konnte eine Aktivierung der T-Zellen von SD52c1 mit HLA-DRB1*0401-transfizierten Maus-Fibroblastenlinien bzw. EBV-transformierten B-Zell-Linien als antigenpräsentierende Zellen induziert werden. Aus den Stimulationsversuchen mit HLA-DRB4*0101 transfizierten Maus-Fibroblastenlinien bzw. EBV-transformierten B-Zell-Linien als antigenpräsentierende Zellen, konnte jedoch auch HLA-DRB4*0101 als ein mögliches Restrikrionselement der Linie SD52c1 definiert werden. Diese zusäzliche B-Kette (HLA-DRB4) bildet mit der A-Kette ebenfalls ein funktionsfähiges HLA-DR-Heterodimer. Dieses Heterodimer, auch HLA-DR53 genannt, kann in mehrere Subklassen eingeteilt werden. Diese unterscheiden sich durch einzelne Aminosäuresubstitutionen. Die Beteiligung des HLA-DRB4*0101 Moleküls an der Präsentation diabetogener Epitope konnte auch schon von *Huck* beschrieben werden [78].

4.1.7 Epitop Mapping

SD32.5

Die Suche nach dem kleinsten bindenden Epitop des Peptides A5-21, das die Linie SD32.5 aktiviert, konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Aus den Ergebnissen der Stimulation mit den 21 überlappenden Peptiden zeigte sich, dass das Epitop in der Überlappungssequenz der Peptide p18-21 beginnt. Eine weitere Eingrenzung war leider nicht möglich, da die Synthese von Alanin-Scans aufgrund der vielen Cysteine (C), die durch Ausbildung von Disulfidbrücken miteinander eine feste Bindung eingehen und so die Konformation des Peptides ändern, fehlschlug. Das von der Linie SD32.5 erkannte Peptid A5-21 wurde bisher in der Literatur lediglich von *Durinovic-Belló* und *Raju* beschrieben [54, 139]. Eine starke Bindungsaffinität dieses Peptides (A5-21) mit HLA-DRB1*0401 konnte jedoch bereits von *Geluk* nachgewiesen werden [63], wobei die vorliegenden Ergebnisse dies unterstützen.

SD52c1 Alanin Scan

Aus den Analysen der bindenden Elemente des Peptides C18-A1 (p17) an antigenpräsentierende Zellen bzw. den T-Zell-Rezeptor ging hervor, dass die um 12 Aminosäuren überlappenden Peptide C13-29 (p16) bzw. C23-A6 (p18) nicht in der Lage waren, die Zellen von SD52c1 zu aktivieren. Die genaue Definition der für die Bindung wichtigen Aminosäuren erfolgte durch die Stimulation mit verschiedenen Alanin-substituierten Peptiden von C18-A1. Dabei wurde der Austausch der Aminosäuren an bestimmten Positionen toleriert, an anderen Positionen bewirkten sie jedoch einen fast vollständigen Abfall des Stimulationspotentials. Auf diese Weise konnten sieben Positionen des Peptides C18-A1 als essentielle Kontaktstellen für die TZR- bzw. MHC-Bindung definiert werden, wodurch die Sequenz PLALEGSLQK als minimales Epitop identifiziert werden konnte. In der Literatur ist das Epitop C18-A1 schon durch verschiedene Autoren als immunodominant beschrieben worden [41, 54]. Eine genauere Charakterisierung dieses Epitopes wurde von *Congia* anhand des HLA-DR4 transgenen Mausmodelles durchgeführt [41]. Hierbei wurde die, im Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit definierten und um die amino-terminale Aminosäure Prolin kürzere, Sequenz LALEGSLQK als minimales Epitop definiert.

Die Spezifität der Peptidbindung an HLA-DRB1*0401 basiert auf Interaktionen der Seitenketten mit den passenden Aminosäureresten in den Bindungstaschen P1, P4, P6, P7 und P9 (P=Pocket). Die Reste der übrigen Aminosäuren zeigen nicht in Richtung MHC-Bindungsstelle. Diese Aminosärereste können daher die TZR-Bindung bewerkstelligen [164, 165], wobei sie mit den Bindungstaschen P0, P2, P3, P5, P8 und P11 des T-Zell-Rezeptors interagieren. Die Bindungsmotive, die von *Hammer* für HLA-DRB1*0401 beschrieben sind, passen nicht zu Peptid C18-A1 [69]. Jedoch ergab ein Vergleich mit den computersimulierten Bindungsaffinitäten aus der SYPHPEITHI-Datenbank (www.syphpeithi.de) eine sehr starke Bindungsmöglichkeit des Peptides C18-A1 an HLA-DRB1*0401. In Abbildung 47 ist die Bindung des Peptides C18-A1 an HLA-DRB1*0401 und den T-Zell-Rezeptor schematisch dargestellt.

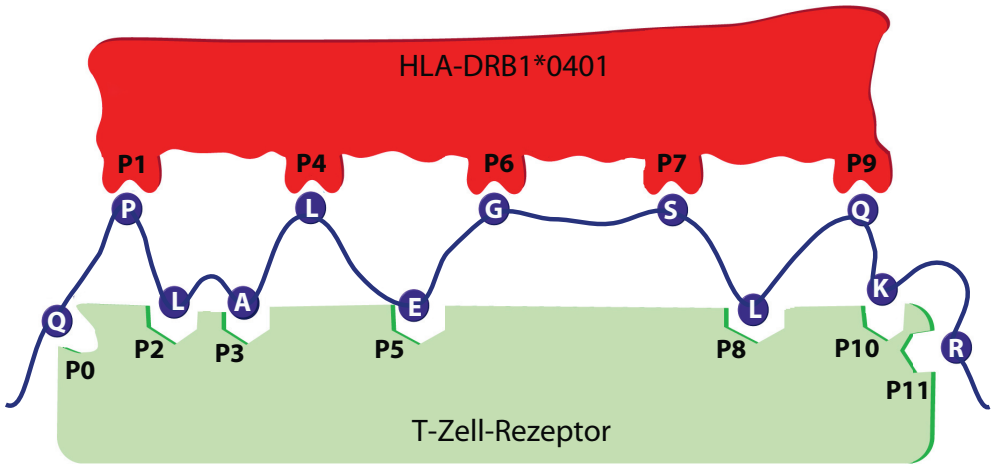


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Interaktionen des trimolekularen Komplexes, bestehend aus Human-Leucocyte-Antigen (HLA)-Molekül, T-Zell-Rezeptor und gebundenem Peptid C18-A1. Dabei ist nur ein Ausschnitt der Peptidsequenz dargestellt (QPLALEGSLQKR). Die Plazierung der Aminosäuren in die HLA-Bindungstaschen (P = Pocket) erfolgte mithilfe der *SYPHPEITHI-Datenbank*.

Obwohl das kleinste definierte für die Bindung wichtige Epitop vollständig auch im überlappenden Peptid p18 (C23-A6) vorhanden ist, konnte dennoch keine Stimulation durch dieses Peptid erzielt werden. Eine mögliche Erklärung ist eine durch bestimmte Aminosäuren des carboxy-terminalen Endes induzierte Veränderung der Peptidkonformation, die dazu führt, dass das Peptid nicht mehr in die Bindungsgrube passt. Eine verringerte Bindungsfähigkeit von Peptid p18 im Gegensatz zu p17 konnte auch durch die computersimulierte Analyse mittels der SYPHPEITHI-Datenbank (www.syphpeithi.de) der Bindungsaffinität an HLA-DRB1*0401 bestätigt werden.

4.1.8 T-Zell-Rezeptor (TZR)-Analyse

Die Spezifität eines T-Zell-Rezeptors wird durch das Rearrangement einzelner variabler Gensegmente der TZR-A und -B-Kette an die jeweilige konstante Region gewährleistet. Diese Spezifität wird durch die hypervariable CDR3-Region erhöht, die durch Nukleotidsubstitutionen in der Grenzregion zwischen dem variablen und dem konstanten Genabschnitt gebildet wird. Der T-Zell-Rezeptor besitzt drei hypervariable Regionen (CDR1-CDR3). Dabei wird von den Regionen CDR1 und CDR2

angenommen, dass sie vor allem mit den MHC-Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen interagieren [37]. Die CDR3 Region hingegen, interagiert mit bestimmten Peptidelementen des TZR-Liganden [37]. Unterschiede in der CDR3-Sequenz wirken sich daher direkt auf die Spezifität jedes T-Zell-Klons aus. Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire der peripheren Blutlymphozyten wird während der T-Zell-Reifung und durch antigenbedingte Anforderungen in der Peripherie gebildet. Aus der Bestimmung der Vβ-Familien und Vα-Familien der PBMC des untersuchten Probanden zeigte sich ein normales Längenverteilungsmuster in allen untersuchten Familien. Nach mehreren Restimulationszyklen konnte eine Veränderung dieses Längenverteilungsmusters von einer Gauss´schen Verteilung bei den PBMC zu einem monoklonalen Peak bei den selektierten epitopspezifischen T-Zell-Linien nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die T-Zell-Rezeptor-Familie Vβ14 als die Familie charakterisiert werden, die sowohl an der Erkennung des Peptides C18-A1 (p17) als auch von A5-21 (p21) beteiligt ist. Die entsprechenden Vα-Familien unterschieden sich jedoch voneinander. Bei der Linie SD52c1 zeigte sich ein interessantes Phänomen. So konnte das Peptid C18-A1 zusätzlich noch von einer T-Zell-Subpopulation, die die TZR-Familien Vβ22 und Vα14 trug, erkannt werden.

Dabei war in den Untersuchungen nicht sicher zu klären, ob es sich bei den Vβ22 tragenden T-Zellen um einen selbstständigen T-Zellklon handelte, der tatsächlich auch C18-A1 spezifisch war. Die Theorie über die klonale Selektion beschreibt, dass Lymphozyten nur einen einzigen spezifischen TZR tragen. *Hardardottir* hat jedoch 1995 die Existenz von T-Zellen, die zwei funktionelle TZR tragen beschrieben [70]. Er fand, dass beide Tzr an verschiedene Antigene in Verbindung mit bestimmten MHC-Moleküle binden [70]. Aus den vorliegenden Ergebnissen, konnte jedoch eindeutig ausgeschlossen werden, dass es sich um einen T-Zell-Klon mit zwei verschiedenen TZR handelte. Die T-Zellen dieses Sub-Klons (SD52c1b) ließen sich zwar nach Anreicherung durch eine Vβ22-MAK-gekoppelte Beadseparation (siehe Kapitel 2.2.2) nicht durch das Peptid C18-A1 stimulieren. Nach Zugabe von IL-2 zeigte sich allerdings ein erneutes Wachstum. Nach anschließender Fragmentanalyse konnten jedoch neben Vβ22 auch Vβ14 positive T-Zellen nachgewiesen werden (*Daten nicht gezeigt*). Diese Beobachtungen lassen auf die Existenz von zwei verschiedene Zelltypen schließen, wobei die Vβ14 positive Zellsubpopulation direkt für die Erkennung des Peptides C18-A1 verantwortlich ist. Die Vβ22-positive Zellsubpopulation könnte daher eher eine co-regulatorische Funktion übernehmen. Die .

4.1.9 Phänotypisierung der Linien

Aus der Phänotypisierung der Linien mittels durchflusszytometrischer Färbung zeigte sich, dass es sich bei beiden Zell-Linien um $CD4^+$ Th-Zellen handelte. Dabei haben die in dieser Untersuchung eingesetzten 16-17 Aminosäure langen Peptide die Generierung von $CD4^+$ Th-Zellen begünstigt. Da es sich um Langzeitkulturen handelte, überraschte die Hochregulierung der CD45RO Marker für Memory Zellen bei beiden Linien nicht. Die Analyse der Aktivierungsmarker ergab für die Linie SD32.5 nach Stimulation mit Peptid A5-21 eine gesteigerte Expression aller untersuchten Aktivierungsmarker, mit Ausnahme von CD38. Bei der Phänotypisierung der Linie SD52c1 zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte Expression aller Aktivierungsmarker. Jedoch war der Stimulationsindex mit Ausnahme der untersuchten Marker Ox40 (CD134) und CD25 viel geringer als bei SD32.5. Die Hochregulierung von Aktivierungsmarkern erfährt ihren Peak in der Regel schon sehr früh. Bei Linie SD52c1 war dieser Peak für die meisten Marker zum Zeitpunkt der Analyse schon überschritten. So wird Ox40 schon nach 24h-48h hochreguliert [184].
Eine mögliche Erklärung für den nach drei Tagen nach Stimulation noch nachweisbar hohen Stimulationsindex ist die Expression von Ox40 durch die nach der Aktivierung einsetzende Expansionsphase. Die gesteigerte CD25 Expression nach drei Tagen ist ebenfalls mit der einsetzenden Proliferation zu erklären. CD25 ist der Marker für die leichte Kette des IL-2 Rezeptors. Nach Aktivierung von T-Zellen werden die IL-2 Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermehrt. Dadurch kann die weitere Zugabe des Wachstumsfaktors IL-2 eine ständige Proliferation der Zellen bewirken.

4.2 Populationsstudie

4.2.1 Zusammenfassung

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass potentiell autoreaktive T-Zellen auch im peripheren Blut von gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden können. Dabei konnte dies durch eine gesteigerte Expression von CD25 nach Stimulation mit Epitopen des PräProInsulins, die auch bei Kontrollpersonen zu finden war, nachgewiesen werden. Die potentiell autoreaktiven T-Zellen unterschieden sich jedoch von den autoaggressiven T-Zellen durch die Expression von Ox40. Bei den T1D-Patienten konnten bezüglich der Ox40 Expression keine „immunodominanten" Epitope definiert werden. Aufgrund der zusätzlichen Untersuchung von drei Ak+ Probanden ist jedoch die Region der Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und A-Kette als ein mögliches Epitop zu betrachten, von dem aus die zelluläre Autoimmunreaktion beginnt. Die Region um das in der Literatur favorisierte B-Ketten Peptid B9-23 konnte aus den vorliegenden Ergebnissen als ein Epitop definiert werden, welches sehr früh nach Einsetzten des 'Epitope Spreadings' erkannt wird. Die Ergebnisse zeigen, dass sich Ox40 als Paramter im Rahmen des Screening T1D gefährdeter Probanden mit hoher Sensitivität eignet. Weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven sollten diese Ergebnisse noch festigen.

4.2.2 Studienpopulationen

Zur Identifizierung autoreaktiver T-Zellen wurden verschiedene repräsentative Kohorten untersucht. Dabei war die Auswahl der untersuchten Probanden mit den in der Literatur beschriebenen Probandenkollektiven vergleichbar [5, 50, 53, 54]. Die Unterteilung der Probanden hinsichtlich des Krankheitsstatus der untersuchten T1D-Patienten unterschied sich jedoch erheblich. So variierten die Kriterien für die Aufnahme in die Gruppe der erstmanifestierten T1D-Patienten in vielen Studien zwischen 2 Wochen [50], 6 Monaten [5] bis hin zu 11 Monaten [54] nach Manifestation. Die Gruppe der T1D-

Patienten, die schon länger an Diabetes erkrankt waren, umfasste meist Probanden mit T1D länger als 3 Jahre. Die Grenze für den Einschluss in die Gruppe der T1D-EM Patienten lag in der vorliegenden Studie bei einem Monat nach Erstmanifestation. Die Auswahl der Kontrollpersonen zeigte ebenfalls große Unterschiede. Im Gegensatz zu dem Kontrollkollektiv dieser Studie wurde das von *Ellis* untersuchte Kontrollkollektiv z.B. nicht nach HLA-Übereinstimmungen zu dem T1D-Kollektiv ausgewählt [55].

4.2.3 Geeignete Oberflächen-Aktivierungsmarker

Aus den Ergebnissen der Phänotypisierung der T-Zell-Linien hat sich gezeigt, dass die Aktivierungsmarker Ox40 und CD25 im Gegensatz zu dem in der Literatur favorisierten Aktivierungsmarker CD69 auch nach drei Tagen Stimulation nachweisbar waren [184]. Daher wurde in der Populationsstudie die Expression von Ox40 und CD25 auf T-Zellen bestimmt. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass für eine optimale Aktivierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zwei Signale benötigt werden. Dabei ist die Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor (TZR) wichtig. Vor allem aber sind Interaktionen von co-stimulatorischen Molekülen und deren Liganden nötig. Dabei wird derzeit vor allem die Interaktion von Ox40 (CD134) und seinem Liganden (Ox40L) diskutiert [184, 185].
In der Literatur ist beschrieben, dass die Ox40 Expression transient ist und nach 24-48h ihren Peak erreicht hat [184]. Im Gegensatz dazu konnte *Endl* in mehreren Kinetik-Versuchen mit PBMC nachweisen, dass in dieser Periode (24-48h) nur sehr schwache Signale erhalten wurden [57]. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass nicht bei allen antigenspezifischen Zellen Ox40 synchron hochreguliert wird. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass zunächst bei antigenspezifischen Zellen - vor allem im Kontext mit Autoimmunerkrankungen - eine Expansion der autoreaktiven T-Zellen erfolgen muss, damit das Nachweislimit von Ox40 erreicht werden kann.

4.2.4 Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten nach in vitro Stimulation

Die Analyse der T-Zellen der untersuchten Probanden ergab, dass eine gesteigerte Expression von Ox40 und CD25 vor allem in der $CD3^+CD45RA^-$ Memory-T-Zell Subpopulation zu finden waren. Dies konnte vor allem nach Tetanus Toxoid Stimulation bei allen untersuchten Probanden nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den von *Sallusto* beschriebenen Ergebnissen überein, wonach die schon *in vivo* geprimten Effektor T-Zellen in der Memory-T-Zell Population zu finden sind [149]. Die Frequenz der autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie ist äußerst gering. Deshalb ist die Identifizierung dieser Zellen schwierig. In der vorliegenden Studie wurden die untersuchten PBMC daher so eingegrenzt, dass nur die Population untersucht wurde, in der die autoreaktiven T-Zellen detektiert werden konnten, d.h. ein Unterschied zwischen autoreaktiven und „normalen" T-Zellen vermutet wurde. Hierzu wurden neben den Antikörpern gegen Ox40 und CD25 zusätzlich fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD3 und CD45RA verwendet. Durch diese Antikörper war es durch die Definierung bestimmter Regionen möglich, nur die $CD3^+CD45RA^-$-Zellen, d.h. die Memory T-Zellen, zu betrachten. Obwohl *Peterson* nachgewiesen hat, dass die T-Zell Reaktivität bei frisch manifestierten T1D-Patienten nur in der CD45RORA doppelpositiven T-Zell Population zu finden sind [130], wurden in der vorliegenden Untersuchung CD45RO-Memory T-Zellen analysiert. Ein Grund hierfür ist die repetitive Restimulation autoreaktiver T-Zellen *in vivo* bei chronischen Autoimmunerkrankungen in zyklischen Abständen. Des weiteren hat *Sallusto* beschrieben, dass sich die *in vivo* geprimeten T-Zellen, die bei erneuter Stimulation sehr schnell rekrutiert werden können (Effektor-T-Zellen), in der CD45RO-Memory-Subpopulation zu finden sind [149]. Die in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse bestätigen dies. Es konnte also festgestellt werden, dass autoreaktive T-Zellen in der Subpopulation der ausgereiften Gedächtniszellen vorkommen. In Tabelle 27 ist die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle dargestellt, die das Alter bzw. den Reifegrad von Th-Zellen darstellen.

Tabelle 27: Exprimierte Oberflächenmarker auf T-Helfer (Th)-Zellen verschiedener Reifungsstadien.

	Co-Rezeptor		*Populationsmarker*		*Homing-Molekül*	*Aktivierungsmarker*		
	CD4	*CD8*	*CD45RA*	*CD45RO*	*L-Selektin*	*CD69*	*Ox40*	*CD25*
Thymus T-Zellvorläufer	+	+	++	-	+	-	-	-
Naive Th-Zellen	++	-	++	-	++	-	-	-
Effektor Th-Zellen	++	-	+	++	-	++	++	++
Memory Th-Zellen	++	-	-	++	-	-	-	+

Durch die Vorinkubation der untersuchten PBMC (16 h in Medium) wurde den professionellen APC, vor allem den dendritischen Zellen, erlaubt , zu reifen und zu adhärieren [61]. Da die Aktivierung durch Ox40 auf der Stärke der Expression des Liganden Ox40L auf den antigenpräsentierenden Zellen beruht [184], stieg die Expression von Ox40 nochmals an (*Daten nicht gezeigt*). Dabei ist die Expression von Ox40L abhängig von dem Aktivierungszustand der APC. Eine weitere Erklärung für die Erhöhung der Ox40 Expression auf T-Zellen nach Vorinkubation der APC hat *Jonuleit* beschrieben. Dabei haben unreife dendritische Zellen sowohl sehr wenig HLA-Klasse-II als auch co-stimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimiert. Diese Zahl steigt jedoch bei der Reifung der dendritischen Zellen an [84].

4.2.5 Einfluss der Co-Stimulation auf die Detektion antigenspezifischer T-Zellen

Dass die Interaktion von co-stimulatorischen Molekülen und deren Liganden für die Aktivierung von T-Zellen benötigt wird, wurde in anderen Abschnitten schon beschrieben. In vielen Publikationen wird daher versucht dieses co-stimulatorische Signal durch Zugabe von verschiedenen Klonen des anti-CD28 Antikörpers zu verstärken, um eine stärkere T-Zell-Reaktivität nachweisen zu können [178]. In der vorliegenden Studie wurde dies bei fünf T1D-Patienten untersucht. Es stellte sich heraus, dass weder die Expression von Ox40, noch die von CD25 durch die verstärkte Co-Stimulation, erhöht wird. Diese Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen von *Viglietta* überein. Danach

war bei T1D-Patienten sowohl die Reaktivität von GAD65-reaktiven T-Zellen als auch von T-Zellen, die mit Tetanus Toxoid stimuliert wurden, unabhängig von einer CD28/B7 Co-Stimulation [178]. Deshalb wurde auf den zusätzlichen Einsatz von CD28 Antikörpern verzichtet. Da die Bedingungen der *in vitro* Versuche so gut wie möglich die *in vivo* Situation widerspiegeln sollen, ist eine zusätzliche Modifikation der APC/T-Zell-Interaktion durch eine nicht-physiologische Menge an co-stimulatorischen Molekülen oder anderen Zusätzen auch eher kritisch zu diskutieren.

4.2.6 Gesamtergebnisse der gesunden Kontrollpersonen im Vergleich zu T1D-Patienten

CD25

Insgesamt konnte beim Vergleich der T-Zell Reaktivitäten kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression von CD25 zwischen T1D-Patienten und Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Sowohl Patienten als auch Kontrollen reagierten auf die Stimuli des PräProInsulin (PPI)-Moleküls. Sowohl bei den T1D-Patienten als auch bei den Kontrollpersonen wurde durch durchschnittlich drei Stimuli (Antigen oder PPI-Peptide) eine gesteigerte CD25-Expression induziert. Der Nachweis einer zellulären Reaktion gegen die eingesetzten Antigene bei gesunden Kontrollpersonen lässt sich dadurch erklären, dass auch bei Kontrollpersonen potentiell autoreaktive T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar sind [29, 72]. Daher deuten die hier beschriebenen Ergebnisse bezüglich der CD25 Expression darauf hin, dass mit diesem Test potentiell autoreaktive T-Zellen identifiziert werden können.

Ox40

Im Gegensatz zu CD25 zeigen die Analysen des Aktivierungsmarkers Ox40 andere Ergebnisse. So konnte eine hochsignifikant gesteigerte Expression von Ox40 nach Stimulation bei T1D-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Dabei waren sowohl die erzielten Stimulationsindizes als auch die Anzahl der erkannten Peptide bei T1D-Patienten höher als bei den untersuchten Kontrollpersonen. Es konnten demzufolge krankheitsassoziierte autoreaktive T-Zellen bei Typ 1 Diabetes auch im peripheren Blut mittels Ox40 nachgewiesen werden, obwohl Ox40 vor allem

auf aktivierten autoantigenspezifischen T-Zellen im entzündeten Gewebe exprimiert wird [183]. *Weinberg* und *Giacomelli* konnten allerdings im peripheren Blut von Patienten mit Rheumatoider Arthritis ebenfalls einen den vorliegenden Ergebnissen entsprechenden Prozentsatz an Ox40 exprimierenden Zellen detektieren [64, 185]. Im Gegensatz zu der doch geringen Menge an Ox40 exprimierenden Zellen im peripheren Blut fand *Weinberg* bei der Analyse der parallel dazu untersuchten Synovialflüssigkeit die 10 fache Menge an Ox40 exprimierenden T-Zellen [185]. Aufgrund der retroperitonealen Lage des Pankreas, ist dieser einer direkten Zellentnahme mittels Punktion aus dem entzündeten Gewebe jedoch nicht oder nur unter ungleich höherem Komplikationsrisiko zugänglich. Daher kann nur vermutet werden, dass bei einer entsprechenden Untersuchung des Pankreasgewebes ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Ox40 exprimierenden Zellzahl zu erwarten sind.
Eine Beteiligung der Ox40/Ox40L Interaktion an der Pathogenese konnte auch noch bei anderen Autoimmunerkrankungen und auch bei Graft-vs.-Host-Reaktionen nachgewiesen werden [120, 185]. Dies ist jedoch der erste Hinweis bei Typ 1 Diabetes, der beschreibt, dass die Interaktionen von Ox40/Ox40L bei der Erkennung des Autoantigens Proinsulin und folglich bei der Pathogenese von T1D eine wesentliche Rolle übernehmen. Die Tatsache, dass Ox40 auf autoreaktiven T-Zellen von Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen nachweisbar sind, macht die Ox40/Ox40L Interaktion zu einem möglichen Ansatzpunkt für eine Immuntherapie. So konnte *Weinberg* durch eine Therapie mit einem Ox40 Immuntoxin die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis im Modell mit *Lewis Ratten* erfolgreich behandeln [185].

Dominante Epitope

Ein weiterer Ansatz für die Entwicklung einer Immuntherapie wäre die Detektion eines immunodominanten Epitopes von Insulin bzw. seinen Prohormonen Proinsulin und Präproinsulin. Dabei könnte die Behandlung von Antikörper positiven (Ak+) Probanden, d.h. von Probanden mit erhöhtem T1D-Risiko, durch Vakzinierung mit immunodominanten Peptiden eine Selbsttoleranz gegen Autoantigene induzieren. In Konsequenz könnte so eine Immunreaktion gegen die β-Zellen unterdrückt werden. Im NOD Mausmodell konnte dies bereits nachgewiesen werden [88, 171].
Während des Verlaufs dieser Studien hat sich jedoch gezeigt, dass die T-Zellen der untersuchten T1D-Patienten gegen unterschiedliche PPI-Peptide reagierten. So wurden alle Peptide, außer PPI-Peptide 13 (B16-32), von den T-Zellen der Patienten erkannt.
Die Tatsache, dass in der Gruppe der T1D-Patienten kein alleiniges „immundominantes“ Epitop, sondern sehr viele immunogene Epitope definiert werden konnten,

wurde auch schon von anderen Autoren für das Autoantigen GAD65 bestätigt [9, 127]. Hierbei spielt das sogenannte 'Epitope Spreading' als charakteristisches Merkmal eines progredierenden Autoimmunprozesses bei Typ 1 Diabetes eine zentrale Rolle [88, 100, 171]. Dabei handelt es sich um eine Ausbreitung einer epitopspezifischen Reaktion auf andere Epitope des gleichen Antigens (intramolekular) bzw. auf Epitope eines anderen Autoantigens (intermolekular). Von 'Epitope Spreading' können sowohl die zellulären Reaktionen als auch die humoralen Reaktionen, d.h. die Erkennung durch Antikörper, betroffen sein [162]. Außerdem kann die Reaktion gegen Insulin bzw. Insulin-Peptide durch die bei T1D lebensnotwendige exogene Insulin-Gabe stark beeinflusst werden. Neben der exogenen Insulin-Applikation erklärt das 'Epitope Spreading' also die fast unmögliche Definierung eines einzigen „immunodominanten" Epitopes bei T1D-Patienten. Aufgrund dessen ist auch die Vakzinierung mit solchen „immunodominanten" Selbstpeptiden, wie es schon bei der Behandlung von Multipler Sklerose beim Menschen versucht wird, nicht sehr erfolgreich. Eine Vielzahl von Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass Myelin Basic Protein (MBP) bei Multipler Sklerose ein Zielantigen ist [6]. Durch Applikation von MBP-Peptiden kann diese Reaktion in vielen Fällen tatsächlich moduliert werden, wobei die Zerstörung der Myelinscheiden im Zentralen Nervensystem inhibiert wird [68]. Bedingt durch 'Epitope Spreading' kann dieses erkannte MBP-Epitop jedoch bei den einzelnen MS-Patienten variieren. Dabei könnten T-Zellen, die gegen andere Peptide reagieren, aktiviert werden. Daher würde trotz Toleranz gegen das eine Epitop die Immunreaktion weiterlaufen. Daraus lässt sich schließen, dass die Identifizierung von „immunodominanten" Epitopen bei T1D-Patienten oder auch bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen sehr schwierig ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch die große Zahl verschiedener bisher publizierter immunodominater Epitope [5, 36, 50, 148]. Im Gegensatz dazu hat sich bei den Ak+ Probanden gezeigt, dass deren PBMC durch Peptide im Bereich der Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und A-Kette (C13-A6) stimuliert werden konnten. Ein Vergleich mit von *Geluk* beschriebenen Bindungsaffinitäten zeigt, dass vor allem HLA-DR4 und HLA-DR2 eine hohe Affinität für Peptid C18-A1 und seine überlappenden Peptide aufweist [63]. Die Ak+ Probanden sind ihrerseits durch den Nachweis dieser HLA-Allele charakterisiert. Hieraus lässt sich also schließen, dass es sich bei der Region C13-A6 möglicherweise um die Region handelt, die primär von autoreaktiven T-Zellen erkannt wird und aufgrund dessen als „immunodominante" Region zu definieren ist. Wie oben beschrieben, ist diese Region nur im Proinsulin-Molekül zu finden und wird ausschließlich in den Langerhans´schen β-Zellen produziert und nicht, wie z.B. Insulin, an die Umgebung abgegeben. Dadurch liegt es nahe, Proinsulin als Target für den Beginn der Autoimmunreaktion bei Typ 1 Diabetes in Betracht zu ziehen. Die Arbeiten von *Rudy, Dubois-LaForgue* und *Ellis* unterstreichen diese Hypothese, wo-

durch eine Reaktivität gegen Proinsulin bei „gesunden" Probanden mit gesteigertem Risiko an T1D zu erkranken – also bei Ak+ - existiert [50, 55, 148]. Eine zelluläre Reaktion gegen Proinsulin bei manifesten T1D-Patienten konnte jedoch nicht festgestellt werden [55]. Die Expression von Proinsulin im menschlichen Thymus übersteigt die von Insulin um ein Vierfaches [135]. Außerdem zeigte *Vafiadis*, dass VNTR Klasse-III Allele mit hohen mRNA-Mengen an Proinsulin im Thymus assoziiert sind, während die homozygote Anlage für Klasse-I VNTR Allele mit einer geringeren Transkription von Proinsulin einhergeht [175]. Demzufolge könnte die hohe Proinsulin-Expression im Thymus in Verbindung mit den Klasse-III VNTR Allelen die negative Selektion von proinsulinspezifischen T-Zellen fördern. Dies wäre wiederum für die Protektion von T1D wichtig. All dies definiert Proinsulin und vor allem die Region C13-A6 als einen wahrscheinlicheren Kandidaten für ein frühes Autoantigen als Insulin.

PräProInsulin Regionen

Am häufigsten wurde die Insulin B-Kette und das B-Ketten Peptid 10 (B16-32) von den untersuchten T1D-Patienten erkannt. Dieses Peptid weist gemeinsame Sequenzen mit in der Literatur schon als „immunodominant" beschriebenen Epitopen auf. Mit dem in der Literatur favorisierten Peptid B9-23 hat es 8 Aminosäuren gemeinsam [5]. Mit einem weiteren beschriebenen „immunodominanten" Epitop p24-33 (B24-C1) überlappt es mit 9 AS [36, 50, 148]. Nach dem auch die Insulin B-Kette in den vorliegenden Versuchen eine Aktivierung der T-Zellen der T1D-Patienten auslösen konnte, liegt es nahe, dass es sich bei der Region B9-32 tatsächlich um eine Region handelt, die einen „immunodominanten" Charakter hat. Insgesamt hat jedoch nur knapp die Hälfte der untersuchten T1D-Patienten eine Reaktion gegen die B-Kette bzw. gegen die Region B11-32 (p9-p11) gezeigt. Die übrigen reagierten gegen andere Epitope. Einer der Ak+ Probanden (Nr.41) war schon seit mehreren Jahren positiv für alle vier Autoantikörper. Die nachgewiesenen T-Zell Reaktionen auf viele Peptide deuten auf eine fortgeschrittene Autoimmunreaktion hin. Es ist davon auszugehen, dass das 'Epitope Spreading' hier schon begonnen hat. Die Dauer der Antikörperpräsenz bei den anderen Ak+ Probanden ist nicht bekannt, da sie zufällig entdeckt wurden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Autoimmunreaktion der T-Zellen der beiden Probanden 42 und 43 erst begonnen hat.

Bei dem Ak+ Probanden Nr. 41, der eine ausgebreitete T-Zell Antwort hatte, konnte eine zelluläre Reaktion auch gegen die Region B11-32 (p9-p11) nachgewiesen werden. Auch *Alleva* konnte eine Reaktion gegen B9-23 bei T1D-Patienten und Ak+ Probanden nachweisen [5]. Aufgrund dessen und der häufigen Erkennung dieser Region von T1D-Patienten kann diese Region als eine Region bezeichnet werden, auf die sich die

beginnende Autoimmunreaktion sehr früh ausbreitet und die vielleicht, bedingt durch die Applikation exogenen Insulins, noch weit nach Manifestation erkannt wird.
Gegen Peptide der A-Kette haben weder die Ak+ Probanden noch die frischmanifestierten T1D-Patienten reagiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass zelluläre Reaktionen gegen Peptide der A-Kette nicht an der Pathogenese von T1D-beteiligt sind, sondern eher ein Produkt der exogenen Insulin-Gabe darstellen. Dies steht jedoch in Teilen im Gegensatz zu den von *Durinovic-Belló* beschriebenen Ergebnissen, wonach das Peptid A5-21 als ein „immunodominantes" Epitop beschrieben wurde [54]. Jedoch bestand die in dieser Studie untersuchte Gruppe von T1D-Patienten aus frischmanifestierten Patienten und Patienten, die schon seit 11 Monaten an T1D erkrankt waren [54].

4.2.7 Beschreibung der T2D-Patienten

Bei den T2D-Patienten war keines der eingesetzten Antigene in der Lage, die T-Zellen zu stimulieren. Dies stimmt mit Ergebnissen von *Alleva* überein, der ebenfalls keine zelluläre Reaktion bei T2D-Patienten nachweisen konnte [5]. Eine Erklärung hierfür ist sicherlich, dass bei Typ 2 Diabetes keine autoimmune Grundlage vorliegt. Deswegen sind auch keine autoreaktiven T-Zellen, die eine zelluläre Immunantwort ausführen können, im T-Zell Repertoir vorhanden.

4.2.8 Ox40-Expression als Screening-Parameter

Mit der Durchführung dieses Tests zur Untersuchung von Ox40 ist es gelungen, die zellulären Reaktionen krankheitsassoziierter autoreaktiver T-Zellen bei T1D-Patienten zu detektieren. Der bisher angewendete Standardversuch zur Detektion der zellulären Reaktion war der Proliferations-Assay. Jedoch war die Nachweisensitivität, vor allem bei der Untersuchung des Einflusses von Insulin bzw. Proinsulin, äußerst gering [48, 148, 153]. Um dennoch eine positive Reaktion nachweisen zu können, haben manche Autoren die Grenze für eine positive Reaktion stark heruntergesetzt, was zu einer eingeschränkten Aussagekraft der Untersuchungen führt. In der Literatur wurde meist

ein Stimulationsindex von 3 als Grenzwert, was dem Mittelwert ± der zweifachen Standardabweichung entspricht, definiert [49, 52, 54]. Eine positive zelluläre Reaktion ist bei *Alleva* jedoch schon ab einem SI von zwei [5], bei *Semana* sogar schon bei einem SI von 1,5 definiert [156].
Der hier beschriebene Test konnte als ein hoch sensitiver und relativ spezifischer Test identifiziert werden. So konnten in der vorliegenden Studie 79% der Probanden mit einer bestehenden zellulären Immunreaktion bei einer Fehlerquote von 25% erkannt werden. Die Analyse der Spezifität und Sensitivität ist natürlich kritisch zu betrachten, da das untersuchte Kollektiv für eine ROC-Analyse sehr klein ist. Jedoch zeigen diese Ergebnisse eine starke Tendenz dahingehend, dass mit diesem Test tatsächlich zelluläre Autoimmunreaktionen identifiziert werden können. Um die Spezifität und Sensitivität dieses Testes jedoch genau zu bestimmen, muss die Untersuchung an einem größeren Probandenkollektiv durchgeführt werden. Es hat sich allerdings gezeigt, dass dieses System auch bei der Untersuchung von zellulären Reaktionen bei anderen Autoantigenen, wie z.B. GAD65 anzuwenden ist [56].

4.3 Schlussfolgerung

Im Mosaik der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus gibt es derzeit noch zahlreiche ungeklärte Immunphänomene. In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Hinweis der Ox40 Beteiligung an der Krankheitsenstehung ein wesentlicher Baustein in diesem lückenhaften Puzzle gefunden werden. Damit ist Ox40 nicht nur ein Parameter, der zur Screeningdiagnostik geeignet ist, sondern vielmehr konnte so auch ein Bindeglied in der Immunreaktion bei T1D zu anderen Autoimmunkrankheiten wie Rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose identifiziert werden.
Desweiteren hat sich in den durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass die Verbindungssequenz zwischen dem C-Peptid und der A-Kette durch eine frühe Beteiligung an der T1D-Pathogenese eine exponierte Rolle in der Immunreaktion bei dem Typ 1 Diabetes mellitus einnimmt.
Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen in der Gesamtschau der bisher bekannten Immunphänomene ein wesentliches Glied in der Kette der noch zu klärenden Fragen dar.

5 Zusammenfassung

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1D) ist eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen mit ständig steigender Inzidenz. Dabei handelt es sich um eine typische organspezifische Autoimmunerkrankung. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in das Pankreas mit selektiver Zerstörung der Insulin-produzierenden Langerhans´schen β-Zellen. Die Krankheitsmanifestation durchläuft hierbei mehrere Stadien. Ziel sollte es also sein, bereits in einem frühen Stadium pathogenetisch relevante Immunprozesse zu identifizieren und hier therapeutisch zu intervenieren. Eine wichtige Rolle kommt der Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen zu. Neben vielen bekannten Autoantigenen, nimmt vor allem Insulin und sein Prohormon Proinsulin (PI) als einziges β-Zell spezifisches Autoantigen eine Sonderrolle ein. Daher wäre die Identifizierung proinsulinspezifischer autoreaktiver T-Zellen zusammen mit der Charakterisierung des trimolekularen Komplexes, bestehend aus humanen Leukozytenantigenen (HLA) von antigenpräsentierenden Zellen, gebundenem Peptid und erkennendem T-Zell-Rezeptor, für die Identifizierung prädiabetischer Patienten und für die Entwicklung einer interventionellen Immuntherapie sehr hilfreich.

Zur Analyse der molekularen Wechselwirkungen des trimolekularen Komplexes wurden in der vorliegenden Studie zwei HLA-DRB1*0401 restringierte T-Zell-Linien von einem T1D-Patienten generiert. Bei der ersten etablierten T-Zell-Linie (SD52c1) handelte es sich um eine proinsulinspezifische T-Zell-Linie. Dabei konnte als minimales Epitop, welches die Zellen dieser Linie aktivierte, die Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und A-Kette nachgewiesen werden. Die letzten drei Aminosäuren des identifizierten immunogenen Proinsulin-Peptides ADSLQPLALEGSLQKRG beinhalten die Aminosäuren, die bei der Spaltung des Proinsulins in Insulin beteiligt sind. Dabei stellt die letzte Aminosäure – Glycin - die Stelle dar, an der die Spaltung durch die Endopeptidase II erfolgt. Die beiden Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) werden

in vivo durch die Carboxypeptidase H abgespalten. Die gesamte für die Aktivierung benötigte Sequenz existiert somit *in vivo* also nur als ein kurzlebiges Zwischenprodukt in den Granula der β-Zellen während der Reifung von Insulin.
Daher besteht kein Zweifel, dass es sich bei dieser T-Zell-Linie um eine T1D-assoziierte Linie handelte, deren Zellen *in vivo* bei der Prozessierung des Hormons Insulin geprimed wurden. Deswegen können die Zellen dieser Linie auch nicht durch die exogene Insulin-Applikation entstanden sein. Unterstützt wird die Identifizierung dieser T1D-assoziierten Linie durch die nachgewiesene natürliche Prozessierung des Peptides C18-A1 aus dem Proinsulin-Molekül.
Bei der zweiten etablierten Linie (SD32.5) war die Spezifität gegen ein Peptid am Ende der A-Kette (A5-21) nachzuweisen. Die Aktivierung der Linie SD32.5 durch dieses Peptid (A5-21) war von der dominanten Sekretion des T-Helfer (Th)1-Zytokins Interferon (IFN) γ begleitet. Die nachgewiesene natürliche Prozessierung dieses Peptides aus dem kompletten Proinsulin-Molekül läßt jedoch nicht darauf schließen, dass die Spezifität der Linie nicht auch durch die exogene Insulin-Applikation, die zum Zeitpunkt der Untersuchung drei Monate andauerte, induziert werden konnte.
Die Ergebnisse der Populationsstudie zeigten, dass potentiell autoreaktive T-Zellen durch die Expression von CD25 nach Stimulation mit PräProInsulin-Peptiden auch im peripheren Blut von gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden können. Diese potentiell autoreaktiven T-Zellen unterschieden sich jedoch von den autoaggressiven T-Zellen durch die zusätzliche Expression von Ox40. Bei den T1D-Patienten konnten bezüglich der Ox40 Expression keine immunodominanten Epitope definiert werden. Jedoch zeigte sich durch die zusätzliche Untersuchung von drei Ak+ Probanden, dass die Region der Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und A-Kette von den T-Zellen aller Ak+ Probanden erkannt wurde. Daher konnte diese Region als Startpunkt der zellulären Autoimmunreaktion definiert werden. Im Gegensatz dazu konnte die Region um das in der Literatur favorisierte B-Ketten Peptid B9-23 aus den vorliegenden Ergebnissen als ein Epitop definiert werden, welches sehr früh nach Einsetzten des '*Epitope Spreadings*' erkannt werden muss.
Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass mit Ox40 ein sehr spezifischer Immunmarker definiert werden konnte, der in der prädiktiven Diagnostik von Typ 1 Diabetes eine Schlüsselrolle einnehmen kann. Durch die Ox40 Untersuchung und auch durch die Generierung von T-Zell-Linien war es möglich, eine immunogene Region zu identifizieren. Das weitere Interesse zukünftiger Studien sollte daher in der Erforschung dieses Peptides bzw. seiner Funktion liegen, um so vielleicht die Basis für eine Immuntherapie, die sich auf die Unterdrückung der initialen Erkennung des Peptides C18-A1 durch autoreaktive T-Zellen bezieht, zu schaffen.

6 Literaturverzeichnis

1. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. N Engl J Med 346: 1685-1691 (2002)

2. Abiru N, Maniatis AK, Yu L, Miao D, Moriyama H, Wegmann D, Eisenbarth GS: Peptide and major histocompatibility complex-specific breaking of humoral tolerance to native insulin with the B9-23 peptide in diabetes-prone and normal mice. Diabetes 50: 1274-1281 (2001)

3. Abraham RS, Kudva YC, Wilson SB, Strominger JL, David CS: Co-expression of HLA DR3 and DQ8 results in the development of spontaneous insulitis and loss of tolerance to GAD65 in transgenic mice. Diabetes 49: 548-554. (2000)

4. Adorini L: Interleukin 12 and autoimmune diabetes. Nat Genet 27: 131-132 (2001)

5. Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, Conlon PJ, Gottlieb PA, Putnam AL, Gaur A: A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. J Clin Invest 107: 173-180 (2001)

6. Alvord EC, Jr.: Conclusion: is myelin basic protein the right antigen and experimental allergic encephalomyelitis the right model for multiple sclerosis? Prog Clin Biol Res 146: 503-508 (1984)

7. Andre I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D: Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 2260-2263 (1996)

8. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW: Human T-cell receptor variable gene segment families. Immunogenetics 42: 455-500 (1995)

9. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 94: 2125-2129 (1994)

10. Atkinson MA, Maclaren NK, Scharp DW, Lacy PE, Riley WJ: 64,000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. Lancet 335: 1357-1360. (1990)

11. Bach JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocr Rev 15: 516-542 (1994)

12. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, DeCamilli P, Camilli PD: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. Nature 347: 151-156 (1990)

13. Baekkeskov SLernmark A: Rodent islet cell antigens recognized by antibodies in sera from diabetic patients. Acta Biol Med Ger 41: 1111-1115 (1982)

14. Baisch JM, Weeks T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra JD: Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 322: 1836-1841. (1990)

15. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 18: 767-811 (2000)

16. Banchereau J Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245-252 (1998)

17. Bell GI, Horita S, Karam JH: A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes 33: 176-183. (1984)

18. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F, et al.: Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. Nat Genet 9: 284-292. (1995)

19. Bennett ST, Wilson AJ, Cucca F, Nerup J, Pociot F, McKinney PA, Barnett AH, Bain SC, Todd JA: IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. J Autoimmun 9: 415-421. (1996)

20. Bergerot I, Arreaza GA, Cameron MJ, Burdick MD, Strieter RM, Chensue SW, Chakrabarti S, Delovitch TL: Insulin B-chain reactive CD4+ regulatory T-cells induced by oral insulin treatment protect from type 1 diabetes by blocking the cytokine secretion and pancreatic infiltration of diabetogenic effector T-cells. Diabetes 48: 1720-1729 (1999)

21. Bingley PJ, Bonifacio E, Gale EA: Can we really predict IDDM? Diabetes 42: 213-220. (1993)

22. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, Bottazzo GF, Gale EA: Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. Diabetes 43: 1304-1310. (1994)

23. Bjork E, Kampe O, Karlsson FA, Pipeleers DG, Andersson A, Hellerstrom C, Eizirik DL: Glucose regulation of the autoantigen GAD65 in human pancreatic islets. J Clin Endocrinol Metab 75: 1574-1576 (1992)

24. Blomqvist M, Juhela S, Erkkila S, Korhonen S, Simell T, Kupila A, Vaarala O, Simell O, Knip M, Ilonen J: Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. Clin Exp Immunol 128: 511-515 (2002)

25. Boehm BO, Manfras B, Seissler J, Schoffling K, Gluck M, Holzberger G, Seidl S, Kuhnl P, Trucco M, Scherbaum WA: Epidemiology and immunogenetic background of islet cell antibody-- positive nondiabetic schoolchildren. Ulm-Frankfurt population study. Diabetes 40: 1435-1439. (1991)

26. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EA, Bottazzo GF: Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin- dependent diabetes. Lancet 335: 147-149. (1990)

27. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D: Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. Lancet 2: 1279-1283. (1974)

28. Bradley BJ, Haskins K, La Rosa FG, Lafferty KJ: CD8 T cells are not required for islet destruction induced by a CD4+ islet-specific T-cell clone. Diabetes 41: 1603-1608 (1992)

29. Burns J, Rosenzweig A, Zweiman B, Lisak RP: Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. Cell Immunol 81: 435-440 (1983)

30. Buschard K, Josefsen K, Horn T, Fredman P: Sulphatide and sulphatide antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 342: 840 (1993)

31. Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, Delovitch TL: IL-4 prevents insulitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. J Immunol 159: 4686-4692 (1997)

32. Campbell IL, Kay TW, Oxbrow L, Harrison LC: Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. J Clin Invest 87: 739-742 (1991)

33. Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, Schatz DA, Riley WJ, Malone J, Schwartz S, Quattrin T, Maclaren NK: Age and family relationship accentuate the risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in relatives of patients with IDDM. J Clin Endocrinol Metab 80: 3739-3743. (1995)

34. Castano L, Russo E, Zhou L, Lipes MA, Eisenbarth GS: Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. J Clin Endocrinol Metab 73: 1197-1201 (1991)

35. Chao CC, Sytwu HK, Chen EL, Toma J, McDevitt HO: The role of MHC class II molecules in susceptibility to type I diabetes: identification of peptide epitopes and characterization of the T cell repertoire. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 9299-9304. (1999)

36. Chen W, Bergerot I, Elliott JF, Harrison LC, Abiru N, Eisenbarth GS, Delovitch TL: Evidence that a peptide spanning the B-C junction of proinsulin is an early Autoantigen epitope in the pathogenesis of type 1 diabetes. J Immunol 167: 4926-4935 (2001)

37. Chothia C, Boswell DR, Lesk AM: The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. Embo J 7: 3745-3755 (1988)

38. Christie MR, Vohra G, Champagne P, Daneman D, Delovitch TL: Distinct antibody specificities to a 64-kD islet cell antigen in type 1 diabetes as revealed by trypsin treatment. J Exp Med 172: 789-794 (1990)

39. Clark PM: Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. Ann Clin Biochem 36 (Pt 5): 541-564 (1999)

40. Cohen-Haguenauer O, Robbins E, Massart C, Busson M, Deschamps I, Hors J, Lalouel JM, Dausset J, Cohen D: A systematic study of HLA class II-beta DNA restriction fragments in insulin-dependent diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci U S A 82: 3335-3339 (1985)

41. Congia M, Patel S, Cope AP, De Virgiliis S, Sonderstrup G: T cell epitopes of insulin defined in HLA-DR4 transgenic mice are derived from preproinsulin and proinsulin. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 3833-3838. (1998)

42. Constant SLBottomly K: Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Annu Rev Immunol 15: 297-322 (1997)

43. Cordell HJTodd JA: Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. Trends Genet 11: 499-504. (1995)

44. Daniel D, Gill RG, Schloot N, Wegmann D: Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. Eur J Immunol 25: 1056-1062 (1995)

45. Dardenne M, Lepault F, Bendelac A, Bach JF: Acceleration of the onset of diabetes in NOD mice by thymectomy at weaning. Eur J Immunol 19: 889-895 (1989)

46. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM, et al.: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. Nature 371: 130-136. (1994)

47. De Smedt T, Smith J, Baum P, Fanslow W, Butz E, Maliszewski C: Ox40 costimulation enhances the development of T cell responses induced by dendritic cells in vivo. J Immunol 168: 661-670 (2002)

48. Dosch H, Cheung RK, Karges W, Pietropaolo M, Becker DJ: Persistent T cell anergy in human type 1 diabetes. J Immunol 163: 6933-6940 (1999)

49. Dotta F, Dionisi S, Viglietta V, Tiberti C, Matteoli MC, Cervoni M, Bizzarri C, Marietti G, Testi M, Multari G, Lucentini L, Di Mario U: T-cell mediated autoimmunity to the insulinoma-associated protein 2 islet tyrosine phosphatase in type 1 diabetes mellitus. Eur J Endocrinol 141: 272-278 (1999)

50. Dubois-LaForgue D, Carel JC, Bougneres PF, Guillet JG, Boitard C: T-cell response to proinsulin and insulin in type 1 and pretype 1 diabetes. J Clin Immunol 19: 127-134 (1999)

51. Durinovic-Bello I, Hummel M, Ziegler AG: Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. Diabetes 45: 795-800. (1996)

52. Durinovic-Bello I, Hummel M, Ziegler AG: Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. Diabetes 45: 795-800 (1996)

53. Durinovic-Bello I, Riedl M, Rosinger S, Maisel N, Kalbacher H, Deeg M, Schreckling HJ, Schlosser M, Ziegler M, Kuehnl P, Boehm BO: Th2 dominance of T helper cell response to preproinsulin in individuals with preclinical type 1 diabetes. Ann N Y Acad Sci 958: 209-213 (2002)

54. Durinovic-Bello II, Boehm BO, Ziegler AG: Predominantly Recognized ProInsulin T Helper Cell Epitopes in Individuals With and Without Islet Cell Autoimmunity. J Autoimmun 18: 55-66 (2002)

55. Ellis T, Jodoin E, Ottendorfer E, Salisbury P, She JX, Schatz D, Atkinson MA: Cellular immune responses against proinsulin: no evidence for enhanced reactivity in individuals with IDDM. Diabetes 48: 299-303 (1999)

56. Endl J: (2001 unveröffentlichte Ergebnisse).

57. Endl J: BMBF-Abschlußbericht, (2000)

58. Endl J, Otto H, Jung G, Dreisbusch B, Donie F, Stahl P, Elbracht R, Schmitz G, Meinl E, Hummel M, Ziegler AG, Wank R, Schendel DJ: Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients. J Clin Invest 99: 2405-2415 (1997)

59. Erlich HA: Principles and applications of the polymerase chain reaction. Rev Immunogenet 1: 127-134 (1999)

60. Fairchild PJWaldmann H: Dendritic cells and prospects for transplantation tolerance. Curr Opin Immunol 12: 528-535 (2000)

61. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P: Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nat Med 5: 1249-1255 (1999)

62. Gammon G, Sercarz EE, Benichou G: The dominant self and the cryptic self: shaping the autoreactive T-cell repertoire. Immunol Today 12: 193-195 (1991)

63. Geluk A, van Meijgaarden KE, Schloot NC, Drijfhout JW, Ottenhoff TH, Roep BO: HLA-DR binding analysis of peptides from islet antigens in IDDM. Diabetes 47: 1594-1601 (1998)

64. Giacomelli R, Passacantando A, Perricone R, Parzanese I, Rascente M, Minisola G, Tonietti G: T lymphocytes in the synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis display CD134-OX40 surface antigen. Clin Exp Rheumatol 19: 317-320 (2001)

65. Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, Weinberg AD, Killeen N, Croft M: The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. J Immunol 165: 3043-3050 (2000)

66. Greenbaum CJ, Sears KL, Kahn SE, Palmer JP: Relationship of beta-cell function and autoantibodies to progression and nonprogression of subclinical type 1 diabetes: follow-up of the Seattle Family Study. Diabetes 48: 170-175. (1999)

67. Gurr W, Yavari R, Wen L, Shaw M, Mora C, Christa L, Sherwin RS: A Reg family protein is overexpressed in islets from a patient with new-onset type 1 diabetes and acts as T-cell autoantigen in NOD mice. Diabetes 51: 339-346 (2002)

68. Hafler DA, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Fukaura H: Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF-beta 1 secreting T cells in patients with multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci 835: 120-131 (1997)

69. Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F: Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. J Exp Med 181: 1847-1855 (1995)

70. Hardardottir F, Baron JL, Janeway CA, Jr.: T cells with two functional antigen-specific receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 354-358 (1995)

71. Haskins KWegmann D: Diabetogenic T-cell clones. Diabetes 45: 1299-1305 (1996)

72. Hawkes CJ, Schloot NC, Marks J, Willemen SJ, Drijfhout JW, Mayer EK, Christie MR, Roep BO: T-cell lines reactive to an immunodominant epitope of the tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in type 1 diabetes. Diabetes 49: 356-366 (2000)

73. Hesse MD, Karulin AY, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M: A T cell clone's avidity is a function of its activation state. J Immunol 167: 1353-1361 (2001)

74. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, Gellert SA, Goldwater PN, Steele CE, Couper JJ, Tait BD, Colman PG, Harrison LC: Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. Diabetes 49: 1319-1324 (2000)

75. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC: T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. Mol Med 4: 231-239 (1998)

76. Howe HS: Rheumatoid arthritis--a review. Ann Acad Med Singapore 27: 83-88 (1998)

77. Huang W, Connor E, Rosa TD, Muir A, Schatz D, Silverstein J, Crockett S, She JX, Maclaren NK: Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. J Clin Endocrinol Metab 81: 2559-2563. (1996)

78. Huck C, Endl J, Walk T, Noessner E, Jung G, Wank R, Schendel DJ: HLA-DR53 molecules restrict glutamic acid decarboxylase peptide presentation to T cells of a Type I diabetes patient: specification of the trimolecular HLA-peptide/T-cell receptor complex. Diabetologia 44: 70-80 (2001)

79. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, et al.: The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. J Exp Med 180: 1849-1860 (1994)

80. Inman LR, McAllister CT, Chen L, Hughes S, Newgard CB, Kettman JR, Unger RH, Johnson JH: Autoantibodies to the GLUT-2 glucose transporter of beta cells in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 1281-1284 (1993)

81. Jacobson S, Sekaly RP, Jacobson CL, McFarland HF, Long EO: HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. J Virol 63: 1756-1762 (1989)

82. Jones DB, Hunter NR, Duff GW: Heat-shock protein 65 as a beta cell antigen of insulin-dependent diabetes. Lancet 336: 583-585 (1990)

83. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH: Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med 192: 1213-1222 (2000)

84. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH: Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. Trends Immunol 22: 394-400 (2001)

85. Karr RW, Gregersen PK, Obata F, Goldberg D, Maccari J, Alber C, Silver J: Analysis of DR beta and DQ beta chain cDNA clones from a DR7 haplotype. J Immunol 137: 2886-2890 (1986)

86. Kasimiotis H, Myers MA, Argentaro A, Mertin S, Fida S, Ferraro T, Olsson J, Rowley MJ, Harley VR: Sex-determining region Y-related protein SOX13 is a diabetes autoantigen expressed in pancreatic islets. Diabetes 49: 555-561 (2000)

87. Katz JD, Benoist C, Mathis D: T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. Science 268: 1185-1188. (1995)

88. 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)

89. Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ: Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 89: 283-292 (1992)

90. Kaufmann JE, Irminger JC, Mungall J, Halban PA: Proinsulin conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. Diabetes 46: 978-982. (1997)

91. Klohe EP, Watts R, Bahl M, Alber C, Yu WY, Anderson R, Silver J, Gregersen PK, Karr RW: Analysis of the molecular specificities of anti-class II monoclonal antibodies by using L cell transfectants expressing HLA class II molecules. J Immunol 141: 2158-2164 (1988)

92. Kockum I, Wassmuth R, Holmberg E, Michelsen B, Lernmark A: HLA-DQ primarily confers protection and HLA-DR susceptibility in type I (insulin-dependent) diabetes studied in population-based affected families and controls. Am J Hum Genet 53: 150-167. (1993)

93. Kolb H: Benign versus destructive insulitis. Diabetes Metab Rev 13: 139-146. (1997)

94. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Lopponen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M: Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. J Clin Invest 101: 327-336. (1998)

95. Lamoureux G, Duquette P, Lapierre Y, Cosgrove B, Bourret G, Labrie L: HLA antigens-linked genetic control in multiple sclerosis patients resistant and susceptible to infection. J Neurol 230: 91-104 (1983)

96. Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL: Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. DNA Cell Biol 13: 505-514 (1994)

97. Lane P: Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells. J Exp Med 191: 201-206 (2000)

98. Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC, Linsley PS, Lowry RP: Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. J Exp Med 176: 1215-1220 (1992)

99. Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC: Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. Nat Immunol 2: 501-507 (2001)

100. Lehmann PV, Sercarz EE, Forsthuber T, Dayan CM, Gammon G: Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. Immunol Today 14: 203-208 (1993)

101. Leslie RD, Atkinson MA, Notkins AL: Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia 42: 3-14. (1999)

102. Lohmann T, Leslie RD, Londei M: T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. J Autoimmun 9: 385-389 (1996)

103. Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI: Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. Nat Genet 4: 305-310. (1993)

104. Maclaren N: Immunotherapy of immune-mediated diabetes. Present and future. Clin Rev Allergy Immunol 19: 277-297. (2000)

105. Manfras BJ, Rudert WA, Trucco M, Boehm BO: Analysis of the alpha/beta T-cell receptor repertoire by competitive and quantitative family-specific PCR with exogenous standards and high resolution fluorescence based CDR3 size imaging. J Immunol Methods 210: 235-249 (1997)

106. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO: Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. N Engl J Med 345: 1036-1040. (2001)

107. Marx A, Schultz A, Wilisch A, Nenninger R, Muller-Hermelink HK: Myasthenia gravis. Verh Dtsch Ges Pathol 80: 116-126 (1996)

108. Maxwell JR, Weinberg A, Prell RA, Vella AT: Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. J Immunol 164: 107-112 (2000)

109. McDevitt HO: Regulation of the immune response by the major histocompatibility system. N Engl J Med 303: 1514-1517 (1980)

110. Merriman TRTodd JA: Genetics of autoimmune disease. Curr Opin Immunol 7: 786-792 (1995)

111. Miller MLChacko JA: Autoimmune CD4+ T cells interfere with immune tolerance to a thymic-independent antigen. J Immunol 140: 4108-4114 (1988)

112. Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC, Colman PG: Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. Nat Genet 27: 218-221. (2001)

113. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136: 2348-2357 (1986)

114. Moss PABell JI: Sequence analysis of the human alpha beta T-cell receptor CDR3 region. Immunogenetics 42: 10-18 (1995)

115. Moss PABell JI: Comparative sequence analysis of the human T cell receptor TCRA and TCRB CDR3 regions. Hum Immunol 48: 32-38 (1996)

116. Moss WC, Irvine DJ, Davis MM, Krummel MF: Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15024-15029 (2002)

117. Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N: Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. J Exp Med 184: 1093-1099 (1996)

118. Mugnaini EN, Egeland T, Syversen AM, Spurkland A, Brinchmann JE: Molecular analysis of the complementarity determining region 3 of the human T cell receptor beta chain. Establishment of a reference panel of CDR3 lengths from phytohaemagglutinin activated lymphocytes. J Immunol Methods 223: 207-216 (1999)

119. Naquet P, Ellis J, Tibensky D, Kenshole A, Singh B, Hodges R, Delovitch TL: T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. J Immunol 140: 2569-2578 (1988)

120. Ndhlovu LC, Ishii N, Murata K, Sato T, Sugamura K: Critical involvement of OX40 ligand signals in the T cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 167: 2991-2999 (2001)

121. Nepom BS, Schwarz D, Palmer JP, Nepom GT: Transcomplementation of HLA genes in IDDM. HLA-DQ alpha- and beta- chains produce hybrid molecules in DR3/4 heterozygotes. Diabetes 36: 114-117. (1987)

122. O'Garra A: Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity 8: 275-283 (1998)

123. Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P, Delespesse G: OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. Blood 92: 3338-3345 (1998)

124. Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD: The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. Diabetologia 31: 747-750. (1988)

125. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. Science 222: 1337-1339. (1983)

126. Panicot L, Mas E, Thivolet C, Lombardo D: Circulating antibodies against an exocrine pancreatic enzyme in type 1 diabetes. Diabetes 48: 2316-2323 (1999)

127. Panina-Bordignon P, Lang R, van Endert PM, Benazzi E, Felix AM, Pastore RM, Spinas GA, Sinigaglia F: Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes. J Exp Med 181: 1923-1927 (1995)

128. Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR: Relationship of the 37,000- and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). J Clin Invest 96: 1506-1511. (1995)

129. Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O, Unanue ER: Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. Immunity 11: 453-462 (1999)

130. Peterson LD, van der Keur M, de Vries RR, Roep BO: Autoreactive and immunoregulatory T-cell subsets in insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetologia 42: 443-449 (1999)

131. Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giegerich G, Hinkkanen A, Epplen JT, Kappos L, Wekerle H: Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 7968-7972 (1990)

132. Pietropaolo M, Castano L, Babu S, Buelow R, Kuo YL, Martin S, Martin A, Powers AC, Prochazka M, Naggert J, et al.: Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. J Clin Invest 92: 359-371 (1993)

133. Pozzilli P: The DPT-1 trial: a negative result with lessons for future type 1 diabetes prevention. Diabetes Metab Res Rev 18: 257-259 (2002)

134. Prat EMartin R: The immunopathogenesis of multiple sclerosis. J Rehabil Res Dev 39: 187-199 (2002)

135. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Jr., Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD: The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. Nat Genet 15: 293-297 (1997)

136. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PM: Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. J Immunol 152: 3183-3188 (1994)

137. Rabinovitch A: Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? [see comments]. Diabetes 43: 613-621 (1994)

138. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC, Power RF: IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. J Immunol 154: 4874-4882 (1995)

139. Raju R, Munn SR, David CS: T cell recognition of human pre-proinsulin peptides depends on the polymorphism at HLA DQ locus: a study using HLA DQ8 and DQ6 transgenic mice. Hum Immunol 58: 21-29 (1997)

140. Riley WJ, Atkinson MA, MacLaren NK: Insulin autoantibodies in pre-diabetes. Adv Exp Med Biol 246: 45-51 (1988)

141. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, et al.: A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. N Engl J Med 323: 1167-1172. (1990)

142. Roep BO: T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. Diabetes 45: 1147-1156 (1996)

143. Roep BO, Kallan AA, Hazenbos WL, Bruining GJ, Bailyes EM, Arden SD, Hutton JC, de Vries RR: T-cell reactivity to 38 kD insulin-secretory-granule protein in patients with recent-onset type 1 diabetes. Lancet 337: 1439-1441 (1991)

144. Rogers PRCroft M: CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen. J Immunol 164: 2955-2963 (2000)

145. Romagnani S: Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunol Today 12: 256-257 (1991)

146. Romagnani S: Lymphokine production by human T cells in disease states. Annu Rev Immunol 12: 227-257 (1994)

147. Rothe H, Faust A, Schade U, Kleemann R, Bosse G, Hibino T, Martin S, Kolb H: Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon-gamma, but not of interleukin-4. Diabetologia 37: 1154-1158 (1994)

148. Rudy G, Stone N, Harrison LC, Colman PG, McNair P, Brusic V, French MB, Honeyman MC, Tait B, Lew AM: Similar peptides from two beta cell autoantigens, proinsulin and glutamic acid decarboxylase, stimulate T cells of individuals at risk for insulin-dependent diabetes. Mol Med 1: 625-633 (1995)

149. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401: 708-712 (1999)

150. Schatz D, Krischer J, Horne G, Riley W, Spillar R, Silverstein J, Winter W, Muir A, Derovanesian D, Shah S, et al.: Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. J Clin Invest 93: 2403-2407. (1994)

151. Schatz DABingley PJ: Update on major trials for the prevention of type 1 diabetes mellitus: the American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). J Pediatr Endocrinol Metab 14 Suppl 1: 619-622 (2001)

152. Schloot NC, Daniel D, Norbury-Glaser M, Wegmann DR: Peripheral T cell clones from NOD mice specific for GAD65 peptides: lack of islet responsiveness or diabetogenicity. J Autoimmun 9: 357-363. (1996)

153. Schloot NC, Roep BO, Wegmann D, Yu L, Chase HP, Wang T, Eisenbarth GS: Altered immune response to insulin in newly diagnosed compared to insulin-treated diabetic patients and healthy control subjects. Diabetologia 40: 564-572 (1997)

154. Schloot NC, Willemen S, Duinkerken G, de Vries RR, Roep BO: Cloned T cells from a recent onset IDDM patient reactive with insulin B-chain. J Autoimmun 11: 169-175 (1998)

155. Schlosser M, Strebelow M, Wassmuth R, Arnold ML, Breunig I, Rjasanowski I, Ziegler B, Ziegler M: The Karlsburg Type 1 Diabetes Risk Study of a Normal Schoolchild Population: Association of beta-Cell Autoantibodies and Human Leukocyte Antigen-DQB1 Alleles in Antibody-Positive Individuals. J Clin Endocrinol Metab 87: 2254-2261 (2002)

156. Semana G, Gausling R, Jackson RA, Hafler DA: T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. J Autoimmun 12: 259-267. (1999)

157. Shackelford DA, Kaufman JF, Korman AJ, Strominger JL: HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function. Immunol Rev 66: 133-187 (1982)

158. Sheehy MJ, Scharf SJ, Rowe JR, Neme de Gimenez MH, Meske LM, Erlich HA, Nepom BS: A diabetes-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles. J Clin Invest 83: 830-835. (1989)

159. Sher ACoffman RL: Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Annu Rev Immunol 10: 385-409 (1992)

160. Shevach EM: Regulatory T cells in autoimmmunity*. Annu Rev Immunol 18: 423-449 (2000)

161. Snell GD, Dausset J, Nathenson S: Histocompatibility. New York: Academic Press. (1976)

162. Sohnlein P, Muller M, Syren K, Hartmann U, Bohm BO, Meinck HM, Knip M, Akerblom HK, Richter W: Epitope spreading and a varying but not disease-specific GAD65 antibody response in Type I diabetes. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. Diabetologia 43: 210-217 (2000)

163. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K: The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. J Exp Med 191: 411-416 (2000)

164. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. Nature 368: 215-221 (1994)

165. Stern LJWiley DC: Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. Structure 2: 245-251 (1994)

166. Strebelow M, Schlosser M, Ziegler B, Rjasanowski I, Ziegler M: Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren. Diabetologia 42: 661-670 (1999)

167. Sun AM, Coddling JA, Haist RE: A study of glucose tolerance and insulin response in partially depancreatized dogs. Diabetes 23: 424-432 (1974)

168. Svejgaard A, Platz P, Ryder LP: HLA and disease 1982--a survey. Immunol Rev 70: 193-218 (1983)

169. Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW: Diabetes mellitus due to viruses--some recent developments. Diabetologia 36: 687-695. (1993)

170. Thomson G, Nicholas FW, Bodmer WF, O'Neill ME, Hedrick PW, Hudes E: Analysis of negative and multiple HLA antigen disease associations. Tissue Antigens 26: 293-306. (1985)

171. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO: Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice. Nature 366: 72-75 (1993)

172. Todd JA: Lawrence Lecture. The Emperor‘s new genes: 1993 RD Lawrence Lecture. Diabet Med 11: 6-16. (1994)

173. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO: HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 329: 599-604. (1987)

174. Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Sovik O, Akselsen HE, Knutsen I, Ronningen KS, Thorsby E: HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. Diabetes 46: 143-149. (1997)

175. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C: Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. Nat Genet 15: 289-292 (1997)

176. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS: Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. Diabetes 45: 926-933. (1996)

177. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, Eisenbarth GS: Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. Diabetes 47: 1857-1866. (1998)

178. Viglietta V, Kent SC, Orban T, Hafler DA: GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. J Clin Invest 109: 895-903 (2002)

179. Vyse TJTodd JA: Genetic analysis of autoimmune disease. Cell 85: 311-318 (1996)

180. Wagenknecht LE, Roseman JM, Herman WH: Increased incidence of insulin-dependent diabetes mellitus following an epidemic of Coxsackievirus B5. Am J Epidemiol 133: 1024-1031 (1991)

181. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ: Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. J Clin Invest 99: 1739-1750 (1997)

182. Wegmann DR, Gill RG, Norbury-Glaser M, Schloot N, Daniel D: Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice. J Autoimmun 7: 833-843 (1994)

183. Weinberg AD: Antibodies to OX-40 (CD134) can identify and eliminate autoreactive T cells: implications for human autoimmune disease. Mol Med Today 4: 76-83 (1998)

184. Weinberg AD: OX40: targeted immunotherapy--implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines. Trends Immunol 23: 102-109 (2002)

185. Weinberg AD, Bourdette DN, Sullivan TJ, Lemon M, Wallin JJ, Maziarz R, Davey M, Palida F, Godfrey W, Engleman E, Fulton RJ, Offner H, Vandenbark AA: Selective depletion of myelin-reactive T cells with the anti-OX-40 antibody ameliorates autoimmune encephalomyelitis. Nat Med 2: 183-189 (1996)

186. Wen L, Chen NY, Tang J, Sherwin R, Wong FS: The regulatory role of DR4 in a spontaneous diabetes DQ8 transgenic model. J Clin Invest 107: 871-880 (2001)

187. Wen L, Wong FS, Tang J, Chen NY, Altieri M, David C, Flavell R, Sherwin R: In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. J Exp Med 191: 97-104 (2000)

188. Wucherpfennig KWEisenbarth GS: Type 1 diabetes. Nat Immunol 2: 767-768 (2001)

189. Yin H, Berg AK, Tuvemo T, Frisk G: Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset. Diabetes 51: 1964-1971 (2002)

190. Yu L, Cuthbertson DD, Maclaren N, Jackson R, Palmer JP, Orban T, Eisenbarth GS, Krischer JP: Expression of GAD65 and islet cell antibody (ICA512) autoantibodies among cytoplasmic ICA+ relatives is associated with eligibility for the Diabetes Prevention Trial-Type 1. Diabetes 50: 1735-1740. (2001)

7 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Lymphozyten-Isolation mittels *Ficoll-Paque™ Plus* Dichte-Gradientenzentrifugation	15
Abb. 2	Schematische Darstellung der Neubauer Zählkammer bei 10-facher Vergrößerung	16
Abb. 3	Schematische Darstellung des PräProInsulin Moleküls	19
Abb. 4	a) Schematische Darstellung des „Split-Well"-Verfahrens nach Pette b) Kriterien für die Beurteilung einer richtigen Negativkontrolle bzw. einer spezifischen Proliferation	23
Abb. 5	Temperaturprofil einer RT-PCR zur Bestimmung von verschiedenen T-Zell-Rezeptor-Familien. a) Annealing-Temperaturen der spezifischen TZRAV Primer b) Annealing-Temperaturen der spezifischen TZRBV Primer	35
Abb. 6	Aufbau des pGEM®-T Vektors	38
Abb. 7	Temperaturprofil einer PCR zur Sequenzierung bestimmter DNA-Abschnitte	42
Abb. 8	Zytokinmuster verschiedener Subpopulationen. a) periphere Blutlymphozyten, b) $CD4^+CD45RO^+$ Memory T-Zellen, c) $CD4^+CD45RA^+$naive/regulatorische T-Zellen	50
Abb. 9	T-Zell-Linien gegen a) Peptid A6-21 (SD32), b) Peptid C18-A1 (SD52)	51

Abb. 10	Dosis-Wirkungs-Kurve der Linie SD32.5	52
Abb. 11	Zytokin-Sekretion von SD32.5 nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid A5-21 (p21).	54
Abb. 12	Dosis-Wirkungs-Analysen von SD52c1	55
Abb. 13	Zytokin-Sekretion von SD52c1 nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid C18-A1 (p17)	56
Abb. 14	Stimulationsversuch mit dem gesamten Proinsulin-Molekül	57
Abb. 15	Dosis-Wirkungs-Kurven mit HLA-nichtidentischen antigenpräsentierenden Zellen	58
Abb. 16	Blockierung der Peptidpräsentation durch anti-HLA-Antikörper	59
Abb. 17	Spezifische Lyse von L-Zellen (Mausfibroblaten) durch T-Zellen von SD52c1 nach Stimulation mit 10µg/ml Peptid C18-A1 (p17)	61
Abb. 18	Zunahme der IFNγ Sekretion von SD32.5 nach Stimulation mit 10µg/ml Peptid A5-21 (p21)	61
Abb. 19	Zunahme der IFNγ Sekretion von SD52c1 nach Stimulation mit 10µg/ml Peptid C18-A1 (p17)	62
Abb. 20	Peptidpräsentation durch EBV-transfizierte B-Zell-Linien bei SD52c1	63
Abb. 21	Crossreaktivitäten von SD32.5	64
Abb. 22	Crossreaktivitäten von SD52c1	66
Abb. 23	Definierung der für die Peptid-Bindung wichtigen Positionen	67
Abb. 24	Darstellung der CDR3-Längenverteilungsmuster aller 26 T-Zellrezeptor Vβ-Familien bzw. Vβ-Subfamilien der PBMC des untersuchten Patienten	69
Abb. 25	Fragmentanalyse der a) Vβ– und b) Vα–familienspezifischen PCR der cDNA von SD32.5	70

Abb. 26	Fragmentanalyse der a) Vβ–familienspezifischen PCR der cDNA von SD52und die CDR3-Verteilungsmuster von Vβ14 bzw. Vβ22	71
Abb. 27	Fragmentanalyse der a) Vβ– und b) Vα–familienspezifischen PCR der cDNA von SD52c1	72
Abb. 28	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von a) einem einzelnen, b) zwei unterschiedlichen Lymphozyten und c) einer Aggregation mehrerer Zellen	74
Abb. 29a-c:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 70 nm dicken Schnitten durch verschiedene Zellen der Linie SD32.5 bzw. autologen antigenpräsentierenden Zellen	75
Abb. 30	Charakterisierung verschiedener Oberflächenmarker bei a) SD32.5 und b) SD52c1	76
Abb. 31	Charakterisierung verschiedener Aktivierungsmarkern bei a) SD32.5 und b) SD52c1	77
Abb. 32	Verteilung der Geschlechter insgesamt und in den untersuchten Gruppen Kontrollen und Typ 1 Diabetes (T1D)-Patienten insgesamt, sowie in den Untergruppen T1D-EM und T1D > 1J	79
Abb. 33	Auswertungskriterien zur Optimierung des Nachweises antigenspezifischer T-Zellen	81
Abb. 34	Einfluss von anti-CD28 Antikörpern auf die T-Zell Stimulation	83
Abb. 35	Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung	84
Abb. 36	Phänotypisierung der antigenspezifischen T-Zellen	85
Abb. 37	Analyse der Ox40 (CD134) und CD25 Expression der	86
Abb. 38	Anzahl der erkannten Peptide	87
Abb. 39	Dargestellt ist die Prävalenz, d.h. der Anteil an Probanden, bei der eine positive Ox40 (CD134) bzw. CD25 Expression der T-Zellen nach Stimulation mit den gesamten Antigenen bzw. den 21 Präproinsulin-Peptiden (p1-21) induziert wurden	88

Abb. 40	Frequenz der von den Typ 1 Diabetes (T1D)-Patienten am häufigsten erkannten Stimuli im Vergleich zu der Frequenz bei Kontrollpersonen	89
Abb. 41	Korrelation zwischen den Aktivierungsmarkern Ox40 (CD134) und CD25 nach Stimulation mit Tetanus Toxoid	91
Abb. 42	Ox40 Expression nach Inkubation mit dem antisense Kontrollpeptid bzw. mit Tetatnus Toxoid bei Kontrollpersonen im Vergleich zu T1D-Patienten	92
Abb. 43	Im Schnitt bei den Typ 1 Diabetes-Patienten (T1D; n=24) und der Kontrollpopulation (n=16) erzielte Summe der Stimulationsindizes ± StdAbw bei der Analyse von Ox40	92
Abb. 44	Vierfeldertafel entsprechend des definierten pathologischen Grenzwertes (Σ = 22,5) für eine bestehende Autoimmunreaktion	93
Abb. 45	Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve für den Aktivierungsmarker a) Ox40 bzw. b) CD25	94
Abb. 46	Aminosäuresequenz des Proinsulin Moleküls und die Lage der immunogenen Peptide, gegen die die Reaktion der T-Zell-Linien SD32.5 bzw. SD52c1 gerichtet war	99
Abb. 47	Schematische Darstellung der Insulin-Biosynthese und des Zeitpunktes an dem die identifizierten immunogenen Peptide A5-21 bzw. C18-A1 entstehen können	100
Abb. 48	Schematische Darstellung der Interaktion des trimolekularen Komplexes, bestehend aus Human-Leucocyte-Antigen (HLA)-Molekül, T-Zell-Rezeptor und gebundenem Peptid C18-A1	108

8 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Chronologische Reihenfolge der bei Typ 1 Diabetes entdeckten Autoantigene	6
Tab. 2	Charakteristika (Alter, Diagnose, HLA-Haplotypen und Antikörper-Titer) der untersuchten Probanden	12
Tab. 3	Grenzwerte für die Bestimmung der Autoantikörper Glutamatdecarboxylase (GADA), Tyrosinphosphatase (IA-2A), Insulin (IAA) und Inselzellgewebe (ICA)	17
Tab. 4	Aminosäure Sequenz, Position und Länge der verwendeten PräProInsulin-Peptide	18
Tab. 5	Aminosäure Sequenz der verwendeten Alanin Scan Peptide	20
Tab. 6	Antikörpermischung verschiedener Ansätze zur intrazellulären Färbung von Zytokinen	27
Tab. 7	Bezeichnung und Funktion der anti-HLA spezifischen monoklonalen Antikörper	29
Tab. 8	Pipettierschema für einen Ansatz der reversen Transkription	32
Tab. 9	Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer für die Bestimmung der T-Zell-Rezeptor (TZR) α- bzw. β-Familien	33

Tab. 10	Pipettierschema für eine RT-PCR (20µl Endvolumen)	34
Tab. 11	Name und Sequenz der bei der Reamplifikation verwendeten „nested“ Primer der konstanten Region	36
Tab. 12	Pipettierschema für eine Reamplifikation (100 µl Endvolumen)	37
Tab. 13	Pipettierschema für eine Ligation (10 µl Endvolumen)	39
Tab. 14	Rezeptur für 40 LB-Ampicillin-Agarplatten	39
Tab. 15	Pipettierschema für eine Sequenzierungs-PCR (10 µl Endvolumen)	41
Tab. 16	Antikörpermischung zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenmarkern	45
Tab. 17	Antikörpermischung zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenmarkern bei der Populationsstudie	46
Tab. 18	Demographische Daten des untersuchten T1D Patienten	48
Tab. 19	HLA-Haplotyp der verwendeten irrelevanten antigenpräsentierenden Zellen	58
Tab. 20a	Spektrum der erhaltenen T-Zell-Rezeptor Sequenzen bei der Analyse von SD32.5	73
Tab. 20b	Spektrum der erhaltenen T-Zell-Rezeptor Sequenzen bei der Analyse von SD52c1	73
Tab. 21	Demographische Daten der Studienpopulation T1D-Patienten insgesamt, sowie der einzelnen Gruppen (EM = erstmanifestiert, T1D>1J = T1D länger als ein Jahr)	78
Tab. 22	Demographische Daten der Gruppe „Kontrollpersonen (KP)“	79
Tab. 23	Demographische Daten der Gruppen „Antikörper positive Probanden (Ak+)“ und Typ-2-Diabetes (T2D)-Patienten	80

Tab. 24	Theoretische ermittelte Bindungsaffinitäten von PräProInsulin Peptiden durch HLA-A*0201, DRB1*0401 und DQB1*0302 Allele	90
Tab. 25	Ox40 (CD134) Expression nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von drei Antikörperpositiven (Ak+) Probanden	96
Tab. 26	Ox40 (CD134) Expression nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten von vier Typ 2 Diabetes (T2D)-Patienten	97
Tab. 27	Exprimierte Oberflächenmarker auf T-Helfer (Th) -Zellen verschiedener Reifungsstadien	114

9 Anhang

9.1 Lösungen

Tabelle A-1: Lösungen für die Zellkultur. *s.h. = selbst hergestellt*

Reagenz	*Zusammensetzung*	*Firma*
PBMC-Isolierungsmedium:	RPMI	Gibco
	1 % Penizillin-Streptomycin	Gibco
Kulturmedium:	Iscoves modified Medium IMDM	Gibco
	1 % Penizillin-Streptomycin	Gibco
	7 % Humanserum	Bio Whittacker
40% Humanserum	40 ml 100% Humanserum	Bio Whittaker
	60 ml IMDM Medium	Gibco
20% DMSO	20 ml 100% DMSO	Sigma
	60 ml IMDM Medium	Gibco
Klonierungsmedium:	44,5 ml Kulturmedium	*s.h.*
	5 ml TCGF (T cell growth factor)	*s.h.*
	500 µl rhIL-2 [10 000U/ml]	Roche Diagnostics
PBS:	8 g NaCl	Baker
	0,2 g KCl	Baker
	1,8 g $Na_2HPO_4 x 2H_2O$	Baker
	0,24 g KH_2PO_4	Merck
	1 L H_2O bidest	

Tabelle A-2: Lösungen für die Zelltrennung. *s.h. = selbst hergestellt*

Reagenz	***Zusammensetzung***	***Firma***
MACS-Puffer	2 mM EDTA	Sigma
	2,5 g BSA	Serva
	500 ml PBS	*s.h.*

Tabelle A-3: Lösungen zur ELISA-Messung. *s.h. = selbst hergestellt*

Reagenz	***Zusammensetzung***	***Firma***
Waschpuffer:	4,5 L H_2O	
	0,5 L 10-fach PBS	*s.h.*
	2,5 ml Tween 20	Serva
Tris HCl pH 8,9:	6,7 g Tris	Roth GmbH
	8,76 g NaCl	Baker
	200 mg Na Azid	Merck
	1 L H_2O	
	mit HCl auf pH 8,9 einstellen	Baker
3% BSA:	30 g BSA	Serva
	1 L 1 x PBS	*s.h.*
	0,5 ml Tween 20	Serva
0,3% BSA:	3 g BSA	Serva
	1 L 1 x PBS	*s.h.*
EDTA:	186 g EDTA	Roth GmbH
	1 L 1 x PBS	*s.h.*
	mit NaOH auf pH 8 einstellen	Baker
Diethanolaminpuffer:	97 ml Diethanolamin	Merck
	800 ml H_2O	
	800 mg $MgCl_2$ x 6 H_2O	Merck
	200 mg Na Azid	Merck
	mit HCl auf pH 9,8 einstellen	Baker

Tabelle A-4: Lösungen für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen. *s.h. = selbst hergestellt*

Reagenz	***Zusammensetzung***	***Firma***
4% PFA:	4 g Paraformaldehyd	Merck
	100 ml PBS	*s.h.*
	> 3ml NaOH	Baker
	mit HCl auf pH 7,5 einstellen	Baker
1% PFA:	10 ml 4% PFA	*s.h.*
	30 ml PBS	*s.h.*
1% BSA:	5 g BSA	Serva
	500 ml PBS	*s.h.*
Cyto-FM:	45 ml 1% BSA	*s.h.*
	5 ml DMSO	Sigma
20 mM EDTA:	0,74448 g EDTA	Roth GmbH
	100 ml PBS	*s.h.*

Tabelle A-5: Lösungen für die ELISPOT-Messungen. *s.h. = selbst hergestellt*:

Reagenz	***Zusammensetzung***	***Firma***
0,05% Tween	500 µl Tween 20	Serva
	1 L PBS	*s.h.*
1% BSA:	10 g BSA	Serva
	1 L PBS	*s.h.*
1% BSA-Tween:	10 g BSA	Serva
	1 ml Tween 20	Serva
	1 L PBS	*s.h.*
Strep-HRP-Lösung	6 µl Strep-HRP	DAKO
	8 ml 1% BSA-Tween	*s.h.*
AEC-Lösung:	100 mg 3 Amino-9 Ethyl Carbazol	Merck
	10 ml DMF	Sigma
AEC-Puffer:	148 ml 0,2 M Essigsäure	Merck
	352 ml 0,2 M Natrium-Acetat	Merck
	1 L H_2O bidest	
	auf pH 5 einstellen	
Entwicklungslösung:	800 µl AEC-Lösung	*s.h.*
	24 ml AEC-Puffer	*s.h.*
	12 µl 30%-iges H_2O_2	Merck

Tabelle A-6: Lösungen für durchflusszytometrische Untersuchungen. *s.h. = selbst hergestellt*

Reagenz	***Zusammensetzung***	***Firma***
FACS-Puffer I:	2,5 g BSA	Serva
	500 ml PBS	*s.h.*
FACS-Puffer II:	2,5 g BSA	Serva
	0,5 g Na Azid	Merck
	500 ml PBS	*s.h.*

Tabelle A-7: Lösungen für die molekularbiologischen Analysen. *s.h. = selbst hergestellt*

Reagenz	***Zusammensetzung***	***Firma***
70%-iges Ethanol:	35 ml 100%-iges Ethanol	Riedel-de-Haen
	15 ml H_2O bidest	
50x TAE-Puffer:	242 g Tris-Base	USB
	57,1 ml Essigsäure	Merck
	100 ml 0,5 M EDTA	Roth GmbH
	mit H_2O bidest auf 1000ml auffüllen	
SOC-Medium:	20 g Trypton	Difco
	5 g Hefeextrakt	Difco
	0,5 g NaCl	Baker
	10 ml 0,25 M KCl	Baker
	5 ml 2 M $MgCl_2$	Sigma
	20 ml 1M Glukose	Sigma
	mit H_2O bidest auf 1000ml auffüllen	
	mit NaOH auf pH 7 einstellen	Baker
LB-Medium:	10 g Trypton	Difco
	5 g Hefeextrakt	Difco
	5 g NaCl	Baker
	mit H_2O bidest auf 1000ml auffüllen	
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	Baker
LB-Agar:	1 L LB-Medium	*s.h.*
	1,5 g Agar	Difco
	Ampizilin	Sigma

Tabelle A-8: Lösungen für die Sequenzierung. *s.h. = selbst hergestellt*

Reagenz	***Zusammensetzung***	***Firma***
10 x TBE-Puffer:	108 g Tris Base	USB
	55 g Borsäure	Cabiochem, Merck
	8,3 g Na_4EDTA	Roth GmbH
	1L H_2O ad iniectabilia	Baxter
10 %-ige APS-Lösung:	1,0 g Ammoniumpersulfat	Eastman chemical
	10 ml H_2O bidest	
6 %-iges Polyacrylamidgel:	30 g Harnstoff	Gibco
	9,0 ml 40 %-ige Acrylamid-Lösung	Bio-RAD
	6,0 ml 10 x TBE-Puffer	*s.h.*
	23,5 ml H_2O ad iniectabilia	Baxter
Loading-buffer	50 mg Blue Dextran	Sigma
	1 ml 25 mM EDTA	Sigma
	4 ml Formamid	Sigma

9.2 Ergebnisse

Abbildung A-1: Interferon γ Sekretion von SD52c1 nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationenen an Peptid C18-A1 bzw. mit 2 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA). Dargestellt sind Abbildungen der Wells des ELISPOT-Assays, sowie die computergestützten Angaben der ermittelten Spots. Dabei wurden jeweils Doppelwerte bestimmt.

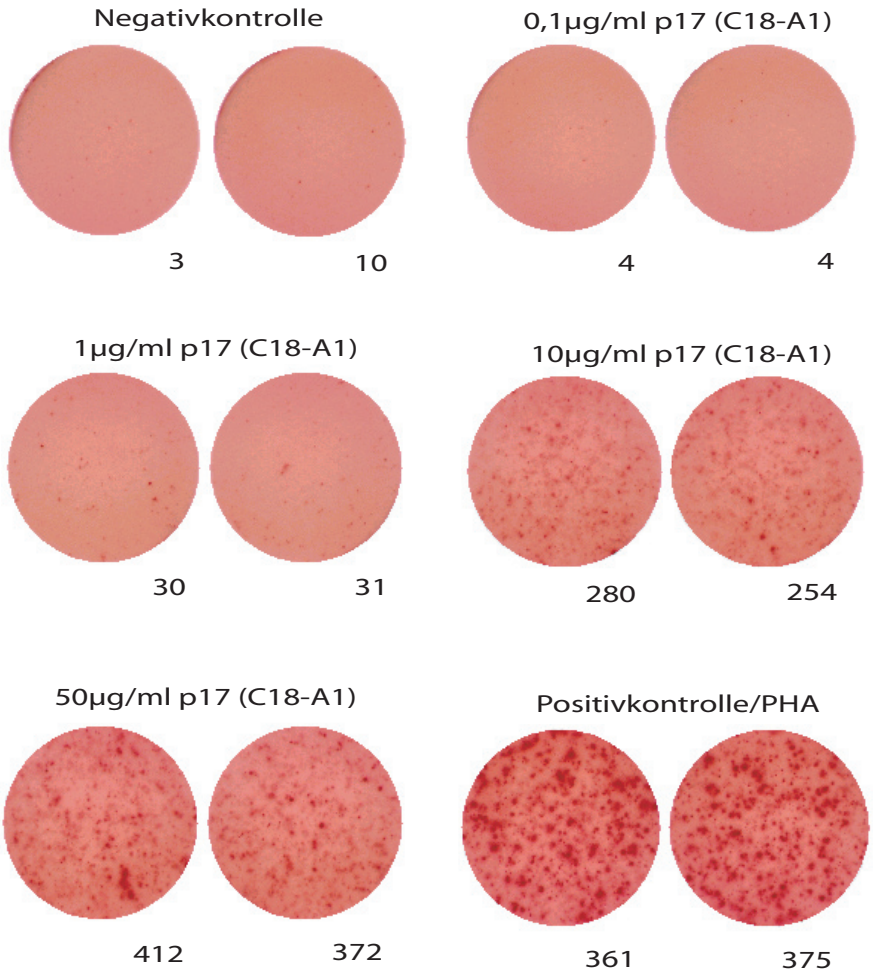


Abbildung A-2: Interleukin-4 Sekretion von SD52c1 nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationenen an Peptid C18-A1 bzw. mit 2 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA). Dargestellt sind Abbildungen der Wells des ELISPOT-Assays, sowie die computergestützten Angaben der ermittelten Spots. Dabei wurden jeweils Doppelwerte bestimmt.

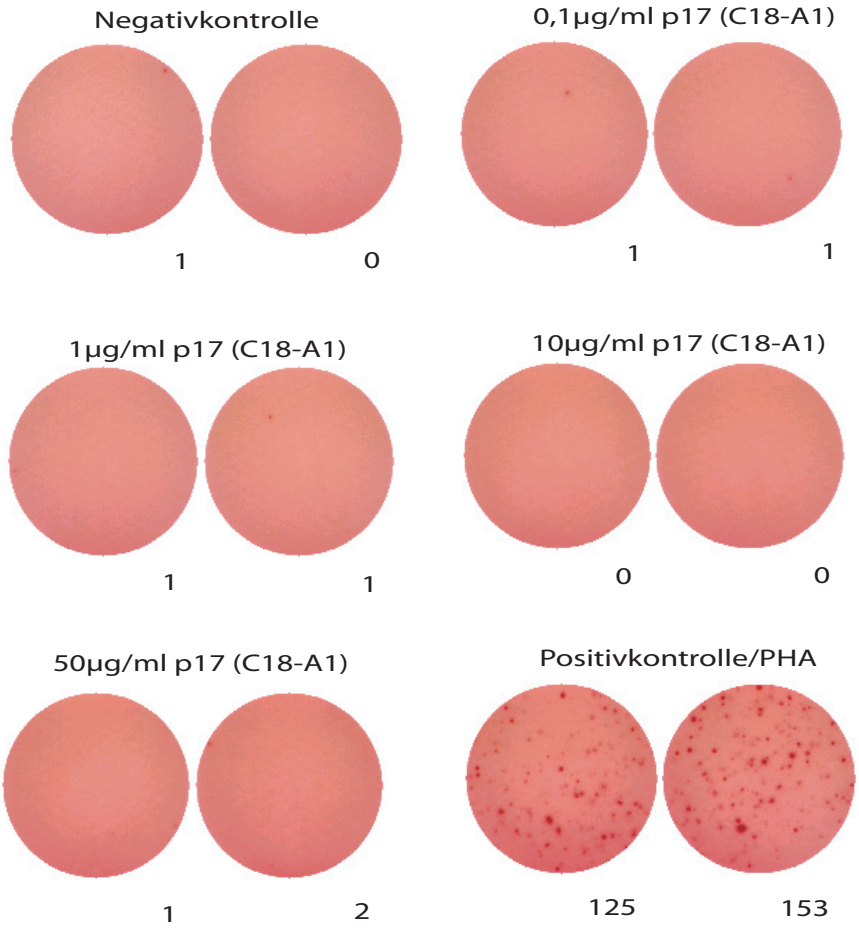


Tabelle A-9: Demographische Daten aller untersucheten Studienpopulationenen. Std.Abw = Standardabweichung, IQR = Interquartilrange des 1. bis 3. Quartils, Ak+ = Antikörper positive (n=3), KP = Kontrollpersonen (n=12), T1D-EM = erstmanifestierte Typ 1 Diabetes-Patienten (n=18), T1D>1J = Patienten mit T1D länger als 1 Jahr (n=8), T1D = Typ 2 Diabetes-Patienten (n=4), GADA = Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase, IA-2A = Antikörper gegen Tyrosinphosphatase, IAA = Antikörper gegen Insulin, ICA = Antikörper gegen Inselzellgewebe.

Parameter		*Mittelwert*	*Std. Abw.*	*Minimum*	*Maximum*	*Varianz*	*Median*	*IQR*
Alter [Jahre]	Total	35,02	13,99	10,00	75,00	195,63	30,50	15,00
	Ak+	28,67	2,31	26,00	30,00	5,33	30,00	3,00
	KP	35,00	10,44	24,00	59,00	108,91	31,00	15,50
	T1D-EM	30,00	12,88	10,00	61,00	166,00	27,00	16,50
	T1D>1J	33,00	5,29	27,00	41,00	28,00	31,00	8,00
	T2D	63,50	10,91	50,00	75,00	119,00	64,50	17,00
GADA [KU/l]	Total	27,23	43,87	0,15	220,40	1924,52	4,38	45,38
	Ak+	104,31	110,51	0,40	220,40	12211,39	92,12	165,00
	KP	0,24	0,12	0,15	0,42	0,01	0,15	0,24
	T1D-EM	34,89	34,34	0,15	101,39	1179,32	14,95	61,19
	T1D>1J	27,84	18,78	0,15	52,06	352,81	33,65	25,15
	T2D	0,33	0,32	0,15	0,80	0,10	0,17	0,35
IA-2A [KU/l]	Total	60,48	141,07	0,27	559,98	19899,49	0,35	56,57
	Ak+	108,87	94,05	0,27	163,17	8845,47	163,17	122,18
	KP	0,32	0,09	0,27	0,52	0,01	0,27	0,04
	T1D-EM	112,50	208,10	0,27	559,98	43307,24	1,30	73,62
	T1D>1J	40,02	49,47	0,27	95,49	2447,50	0,82	93,22
	T2D	0,31	0,07	0,27	0,42	0,01	0,27	0,07
IAA [µU/l]	Total	1755,76	3282,21	-5,58	13717,11	10772885,22	171,12	834,49
	Ak+	2852,56	3803,26	362,61	7230,41	14464794,02	964,66	5150,85
	KP	37,65	40,13	-3,91	115,03	1610,71	32,67	49,98
	T1D-EM	1033,83	2186,38	0,65	8170,15	4780268,59	226,32	682,45
	T1D>1J	5768,38	4701,29	23,40	13717,11	22102096,03	6113,32	5878,53
	T2D	60,18	96,63	-5,58	171,12	9337,10	14,99	132,53
ICA [JDFU]	Total	43,16	72,86	0,00	320,00	5308,68	0,00	80,00
	Ak+	160,00	160,00	0,00	320,00	25600,00	160,00	240,00
	KP	17,78	35,28	0,00	80,00	1244,44	0,00	20,00
	T1D-EM	45,33	56,30	0,00	160,00	3169,52	40,00	80,00
	T1D>1J	45,71	78,07	0,00	160,00	6095,24	0,00	120,00
	T2D	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle A-10: CD25 Expression nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten aller untersuchten Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulationsindizes (SI). Ein SI≥3 (farbig, bzw. fett bei TetanusToxoid) wurde als positiv gewertet. p =Peptid.

													CD25-Expression (Stimulationsindex) [SI]														
	Nr.	*Pro-insulin*	*Insulin*	*Insulin B-Kette*	*p1*	*p2*	*p3*	*p4*	*p5*	*p6*	*p7*	*p8*	*p9*	*p10*	*p11*	*p12*	*p13*	*p14*	*p15*	*p16*	*p17*	*p18*	*p19*	*p20*	*p21*	*Tetanus Toxoid*
T1D-EM	1	3,00	0,89	5,11	1,67	2,78	5,56	3,11	2,78	0,11	0,11	0,67	0,00	2,11	1,22		0,44	1,00	0,22	1,00	0,22	1,11	0,56	0,11	0,22	145,67
	2	3,60	1,46	1,11	0,43	1,83	1,66	6,46	2,43	0,57	0,89	3,00	1,37	2,77	4,83		0,46	3,80	0,34	2,43	0,60	0,23	0,17	0,80	3,26	6,94
	3	0,30	0,30	5,20	0,90	1,40	2,00	1,10	2,00	3,10	1,40	0,60	1,40	4,40	0,50		1,30	0,60	1,10	1,40	0,60	1,50	0,90	0,00	1,50	131,30
	4	1,50	0,80	7,60	1,80	1,60	2,00	12,10	2,90	2,10	2,10	1,60	0,40	3,00	3,40	2,60	1,20	1,20	3,00	15,40	5,00	0,20	2,10	3,00	0,90	28,00
	5	1,00	0,63	0,83	0,13	0,04	0,25	0,21	0,50	0,88	1,63	0,04	0,38	0,67	0,00	4,88	0,63	0,67	0,08	0,21	0,33	0,04	0,08	0,04	0,04	78,96
	6	0,75	0,81	0,44	1,50	0,69	0,44	4,06	0,88	2,63	0,19	2,69	0,19	0,81	0,00	2,00	0,44	0,56	1,69	0,31	0,63	0,13	0,75	0,31	0,69	3,75
	7	0,33	0,78	2,06	1,56	0,56	0,67	4,39	1,28	0,22	0,72	1,22	1,78	4,28	0,06	0,50	0,39	1,50	0,33	0,94	0,67	0,06	1,00	0,33	2,00	77,44
	8	1,34	1,23		1,28	1,39	1,35	1,16	1,36	1,29	1,36	1,39	1,25	1,61	1,52	1,48	1,18	1,48	1,24	1,23	1,64	1,38	1,47	1,26	1,29	7,20
	9	7,64	6,27	5,55	0,55	1,18	1,45	0,36	15,45	8,18	6,27	3,09	0,00	21,27	18,73	0,64	1,00	14,64	4,55	0,00	6,91	0,18	2,09	0,91	2,09	114,27
	10	2,05	1,16	9,00	0,26	2,53	1,58	0,53	1,26	3,42	2,21	8,79	0,58	4,11	2,32	2,16	1,53	1,58	3,37	9,95	9,95	1,42	1,26	0,11	1,37	55,84
	11	1,47	0,79	2,89	2,58	1,21	1,26	1,00	2,74	3,58	1,11	1,58	0,47	1,47	0,89	1,63	0,63	1,84	0,68	1,26	0,58	1,47	1,05	0,32	0,63	9,05
	12	4,11	2,94	5,72	1,89	2,00	5,39	3,11	4,67	4,33	4,67	2,44	1,39	3,50	2,33	2,89	3,89	1,44	1,17	1,11	1,22	2,56	2,33	1,67	2,44	5,00
	13	11,29	9,43	21,86	2,29	7,86	5,43	0,15	0,06	0,54	5,43	1,71	7,14	4,71	2,14	8,43	1,14	14,71	5,57	4,29	5,71	1,00	3,57	2,71	9,43	49,43
	14	0,82	1,76		0,99	1,31	1,65	1,35	1,33	1,27	1,29	1,39	0,92	2,15	1,59	1,64	1,37	1,29	1,53	1,82	1,53	1,57	1,34	1,21	1,24	15,83
	15	2,78	2,66	5,71	0,68	1,65	1,35	1,08	3,10	1,10	0,49	0,60	0,51	1,07	0,56	0,66	0,59	0,95	1,10	3,68	0,94	0,55	0,64	1,00	1,10	10,81
	16	2,79	1,11	10,32	1,21	0,58	1,26	0,32	6,11	1,16	1,26	1,16	0,42	3,84	2,42	1,89	0,84	1,68	1,63	3,47	0,89	1,79	1,05	3,37	1,68	69,79
T1D>1J	17	1,93	1,76	6,24	1,63	2,54	0,44	0,54	0,90	0,88	0,71	0,49	1,22	0,90	1,76	0,41	0,49	0,24	0,66	1,10	0,29	1,44	0,41	1,02	0,07	15,37
	18	4,50	1,90	4,30	1,00	0,00	1,30	1,90	2,10	1,10	1,00	1,00	1,80	1,30	1,60	1,60	2,10	2,40	0,80	1,10	1,10	3,00	1,10	2,40	1,30	56,50
	19	0,90	4,08	1,53	0,71	0,27	0,16	0,75	0,76	1,18	0,12	0,00	0,00	0,10	6,71		0,08	0,25	0,35	0,10	0,04	0,35	0,04	0,00	0,00	22,06
	20	3,58	0,68	3,25	1,20	1,40	1,28	1,45	1,60	2,65	2,40	2,40	1,88	2,05	0,83	2,13	2,18	1,35	1,05	2,30	2,03	1,68	0,78	1,25	1,00	13,45
	21	4,36	0,79	5,11	0,43	0,14	0,50	0,89	1,07	0,43	0,68	2,54	0,54	1,93	0,71	3,14	0,57	1,14	0,54	0,50	0,71	0,46	0,04	0,18	1,68	22,71
	22	1,45	1,03	0,95	0,55	0,68	0,80	1,00	0,50	1,60	0,18	0,80	0,08	0,85	0,55	0,40	0,10	0,33	0,25	0,53	1,30	0,18	0,23	0,20	0,45	6,95
	23	0,86	1,21	12,00	1,96	4,25	5,14	0,15	0,06	0,54	4,21	3,61	2,29	4,75	5,32	0,14	0,07	0,29	2,82	0,04	3,04	3,82	1,64	3,39	0,71	5,07
	24	0,86	0,80		0,51	0,86	0,86	0,94	0,57	1,00	1,14	0,71	1,49	5,86	0,66	1,57	0,86	1,14	0,57	2,03	1,57	1,03	1,20	1,89	1,20	18,97
	25	3,35	0,35	10,94	3,00	3,47	1,35	1,53	0,71	1,88	3,76	0,82	5,41	4,71	0,65	1,12	2,35	0,94	2,29	2,82	2,71	6,18	3,06	0,65	0,88	51,47
	26	1,20	1,20	2,60	1,70	2,80	1,60	2,20	5,10	2,40	1,90	0,60	1,10	2,50	3,20	0,50	0,60	0,80	2,50	2,60	1,10	5,30	1,00	0,80	0,50	83,50
	27	0,53	1,12	2,00	2,76	0,12	0,53	1,12	0,00	0,06	1,18	0,06	1,59	0,12	0,88	0,12	0,06	0,53	0,06	1,18	0,00	0,65	0,41	2,12	1,71	39,35
	28	2,90	0,20	3,55	0,70	2,65	0,25	0,85	0,40	1,20	0,55	1,00	0,40	1,95	0,65	0,45	0,30	0,30	0,25	0,60	0,25	2,70	0,55	1,35	0,50	26,75
	29	1,26	0,47	2,68	0,74	0,89	1,11	0,47	1,00	0,63	0,74	0,53	0,26	1,05	0,21	0,32	0,53	0,74	0,89	0,32	0,42	0,58	0,42	0,89	0,26	6,89
KP	30	2,04	0,63	1,23		1,09	0,41	0,15	0,06	0,54	0,99	1,33	0,52	0,99	1,10	1,34	0,75	0,70	0,97	1,29	1,91	0,77	1,38	1,53	1,67	15,77
	31	1,40	3,30	5,00	0,45	1,35	3,70	1,90	4,15	2,65	2,25	3,25	2,00	3,15	2,20	2,30	1,40	1,55	0,95	4,10	4,25	2,15	2,40	4,20	2,05	5,90
	32	2,75	2,20	8,75	1,25	2,80	1,00	0,15	0,06	0,54	1,25	0,45	0,90	1,15	1,60	2,40	0,70	0,45	0,75	4,35	4,35	1,55	5,20	2,25	3,85	12,45
	33	3,47	4,27	2,33	9,13	14,40	1,80	0,15	0,06	0,54	2,33	2,00	1,47	5,93	9,60	1,67	2,67	9,73	5,93	1,93	1,40	10,33	11,73	3,27	1,00	37,73
	34	0,88	1,00	1,29	0,67	0,92	1,33	0,15	0,06	0,54	0,92	1,17	1,08	1,33	1,29	1,25	2,21	1,71	1,67	1,08	1,25	2,21	0,63	0,46	0,71	7,96
	35	1,94	0,38	3,19	1,13	0,88	0,44	1,00	0,50	1,63	1,81	1,13	0,75	1,00	1,56	1,63	0,69	1,13	0,13	0,69	0,94	0,56	1,69	1,50	1,06	15,00
	36	5,64	1,03	3,96	2,78	1,04	4,11	0,15	0,06	0,54	0,85	1,51	0,67	2,05	1,30	1,23	1,16	2,82	3,41	3,16	1,56	2,95	1,79	2,26	1,05	19,21
T2D	37	0,85	0,77	0,85	0,15	0,54	0,62	0,54	0,92	0,31	2,38	0,46	1,15	0,31	0,31	0,54	0,00	1,46	0,85	0,31	0,46	0,69	0,62	1,15	0,38	2,77
	38	0,79	0,81	1,50	0,60	0,41	0,43	0,12	0,53	1,03	0,66	0,62	0,33	0,59	0,67	0,12	0,33	1,41	0,71	0,31	0,38	0,78	0,31	0,72	0,33	1,14
	39	3,65	1,35	2,69	2,08	1,46	1,15	1,88	1,96	1,00	1,58	0,88	0,46	0,85	2,73	1,12	0,65	1,46	0,88	0,65	0,08	0,23	0,62	0,77	0,27	22,69
	40	2,13	0,47	1,66	0,47	1,02	0,94	2,34	0,43	0,09	0,89	0,38	0,21	0,94	0,72	1,45	0,43	1,15	1,43	0,81	0,09	0,38	0,64	0,21	0,09	15,45
Ak+	41	4,62	2,43	5,27	0,39	0,76	2,30	1,00	0,35	1,10	1,73	1,01	0,50	2,14	1,25	3,05	1,81	1,08	1,71	1,07	3,69	0,61	2,87	0,78	0,86	18,60
	42	1,08	0,95	1,48	0,38	0,92	0,49	0,15	0,06	0,54	1,08	0,48	0,68	1,14	1,25	1,05	1,44	0,70	1,25	1,37	1,53	1,51	0,83	0,47	1,61	2,98
	43	2,07	0,57	1,50	0,27	1,17	1,10	0,15	0,06	0,54	0,07	0,77	0,67	0,30	0,67	1,97	2,60	0,77	0,83	0,67	1,13	1,10	0,30	0,67	0,13	5,63

Tabelle A-11: Ox40 (CD134) Expression nach Stimulation der peripheren Blutlymphozyten aller untersuchten Probanden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulationsindizes (SI). Ein SI≥3 (farbig, bzw. fett bei TetanusToxoid) wurde als positiv gewertet. p =Peptid.

					Ox40-Expression (Stimulationsindex) [SI]																					
	Nr.	*Pro-insulin*	*Insulin*	*Insulin B-Kette*	*p1*	*p2*	*p3*	*p4*	*p5*	*p6*	*p7*	*p8*	*p9*	*p10*	*p11*	*p12*	*p13*	*p14*	*p15*	*p16*	*p17*	*p18*	*p19*	*p20*	*p21*	*Tetanus Toxoid*
T1D-EM	1	2,1	0,9	5,9	1,6	2,1	1,3	3,5	3,3	0,1	1,3	0,5	0,6	5,0	1,0		0,5	1,1	1,0	1,4	0,5	1,5	0,9	0,8	0,3	**271,9**
	2	3,0	2,1	2,1	1,0	1,7	2,3	3,9	3,9	1,5	1,3	3,7	1,2	2,5	4,9		0,5	4,1	0,5	5,6	1,1	0,4	0,5	1,3	1,7	**4,3**
	3	1,2	1,2	2,8	0,5	0,1	0,8	0,3	0,9	0,2	0,4	0,3	0,6	1,2	0,7		1,6	0,6	0,7	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	**153,3**
	4	0,3	0,3	2,9	1,0	0,3	0,8	7,7	0,8	1,3	0,2	0,5	0,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,3	1,0	7,9	1,4	0,8	0,8	2,3	0,0	**19,3**
	5	1,0	5,6	0,8	0,3	0,3	1,0	0,3	0,4	0,5	1,4	0,2	0,3	0,4	0,2	4,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	**74,3**
	6	0,9	0,2	0,3	1,8	0,7	0,9	6,0	0,9	3,6	0,2	2,7	0,4	1,4	0,2	3,9	0,9	0,2	7,4	0,3	0,3	0,2	1,0	0,2	1,1	**10,4**
	7	0,8	0,9	1,8	1,2	0,6	0,4	4,2	1,1	0,4	0,4	0,5	1,5	4,0	0,4	0,6	0,3	2,5	0,4	0,3	0,6	0,7	1,3	0,8	2,3	**140,1**
	8	2,8	1,6		2,5	2,7	2,0	0,8	1,9	1,7	2,1	1,7	2,2	1,3	1,7	3,3	1,5	2,8	1,9	0,8	2,7	2,7	2,0	1,0	1,8	**12,2**
	9	6,0	2,6	3,5	0,9	0,6	1,6	0,5	12,8	6,0	2,7	2,5	3,3	16,9	34,2	1,3	0,5	18,4	4,0	3,2	4,6	0,5	1,1	0,9	0,5	**201,8**
	10	1,7	0,5	2,7	0,3	1,0	0,6	0,1	0,5	1,0	1,5	4,4	0,8	3,0	1,6	1,6	1,8	1,6	2,5	4,1	6,1	1,3	1,2	1,3	1,2	**37,6**
	11	1,7	1,6	2,3	1,6	1,3	1,5	1,4	1,8	2,6	0,8	1,3	1,0	1,2	0,8	1,0	0,8	1,2	0,7	0,9	1,0	1,2	1,0	0,8	0,9	**7,5**
	12	1,8	1,1	3,0	1,6	1,0	4,7	1,3	1,3	1,4	1,3	1,1	1,0	1,4	1,1	0,7	1,9	1,1	0,8	2,4	0,6	1,4	1,1	1,3	0,7	2,1
	13	1,6	1,3	2,5	1,2	1,1	1,5	0,1	0,1	0,2	1,3	1,3	1,8	1,7	1,8	1,8	2,0	1,7	2,0	2,4	2,1	2,4	1,9	2,7	2,5	**27,1**
	14	1,5	4,0		1,2	1,6	3,6	1,7	1,9	1,0	1,6	1,5	1,0	6,0	2,2	2,4	2,6	1,5	2,1	2,6	1,5	1,9	1,6	1,1	1,3	**74,0**
	15	3,5	2,8	6,9	0,6	1,6	1,8	1,1	2,6	1,2	0,3	0,5	0,4	1,3	0,5	0,6	0,3	1,1	1,3	4,1	0,7	0,3	0,3	1,0	1,1	**14,9**
	16	2,5	1,2	10,0	2,0	1,2	1,4	0,9	3,9	1,1	1,0	0,9	0,9	2,9	1,6	0,9	0,9	0,7	1,5	2,4	1,1	1,0	0,8	2,6	2,4	**28,7**
	17	1,2	2,1	5,1	1,5	2,8	1,0	0,7	0,9	1,3	1,0	1,0	2,0	1,9	3,1	0,9	0,9	0,6	1,1	1,3	0,5	2,6	0,4	1,3	0,5	**8,9**
	18	3,3	1,5	2,2	1,3	1,0	1,6	0,9	2,0	1,3	1,1	1,2	1,3	1,1	0,9	1,1	1,7	1,3	0,8	0,9	1,4	1,6	1,2	1,4	1,1	**48,4**
	19	0,8	6,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,3	0,7	1,5	0,2	0,3	0,0	0,4	8,0		0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,4	**28,7**
	20	1,6	0,7	2,7	0,4	1,1	0,6	0,7	0,9	1,1	1,5	2,5	0,8	0,7	0,6	0,5	0,7	0,6	0,2	0,9	0,7	0,9	0,5	0,4	0,5	**18,7**
	21	5,1	1,4	13,6	1,0	0,7	0,8	1,6	1,5	1,0	1,1	3,0	0,8	2,4	1,1	3,4	2,0	1,3	0,8	0,9	1,0	1,8	0,6	1,1	4,1	**70,4**
	22	1,3	2,0	1,5	0,5	1,2	1,0	0,1	0,1	0,2	0,3	1,1	0,6	1,5	1,1	0,6	0,5	0,5	0,7	1,1	1,8	0,6	0,6	0,4	1,1	**7,6**
	23	0,8	1,4	11,5	2,2	4,9	5,8	0,1	0,1	0,2	5,0	4,5	3,3	6,8	6,3	0,7	0,3	0,7	4,5	0,3	4,4	6,5	3,0	6,3	1,5	**8,8**
	24	1,1	1,1		0,7	1,0	1,1	1,6	0,8	1,0	0,9	1,0	1,9	13,0	0,8	1,3	1,8	1,5	0,8	3,4	1,5	1,5	1,0	3,3	1,4	**42,6**
	25	1,3	0,6	5,0	1,1	2,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,9	1,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,9	1,0	1,5	0,7	0,4	0,5	**41,8**
	26	0,2	0,2	0,7	0,3	1,0	0,3	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,5	1,3	0,5	0,5	1,0	0,7	0,3	0,3	**96,8**
	27	0,7	0,2	0,8	0,8	0,3	0,8	0,8	1,1	1,0	1,0	1,3	1,7	1,0	1,1	0,7	1,1	0,8	1,2	1,1	1,3	1,1	0,8	1,7	1,4	**34,8**
	28	0,8	0,5	0,6	0,4	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,2	0,6	0,4	**23,8**
	29	1,5	1,0	0,7	0,6	0,6	1,2	0,6	1,0	0,7	0,7	0,7	0,9	0,6	0,8	0,6	0,6	0,7	0,8	0,9	0,5	0,5	0,3	0,7	0,5	**3,7**
	30	2,1	0,3	1,4		0,8	0,5	0,1	0,1	0,2	0,9	1,3	0,5	0,9	1,3	1,4	0,5	0,7	0,8	3,2	3,2	1,1	1,4	1,7	1,9	**23,2**
	31	1,9	2,7	2,5	1,2	1,6	2,1	1,0	1,5	1,4	1,1	1,7	1,0	2,0	1,4	1,1	0,9	1,3	1,0	1,5	1,6	1,5	1,7	1,7	1,8	**3,2**
	32	0,8	0,8	2,4	0,8	1,0	1,5	0,1	0,1	0,2	1,2	1,4	2,2	2,6	1,2	2,2	2,1	1,8	2,6	2,7	2,3	1,9	2,1	1,9	1,9	**7,8**
	33	1,4	1,0	2,6	1,0	1,8	1,0	0,1	0,1	0,2	0,9	1,0	1,0	2,0	1,4	0,9	1,2	0,9	1,1	0,7	0,9	1,1	1,0	1,0	0,7	**6,6**
	34	1,1	1,3	1,1	0,7	0,9	1,5	0,1	0,1	0,2	0,9	1,7	1,4	1,7	1,6	1,4	1,9	2,3	1,8	1,4	1,9	2,9	1,0	1,1	0,9	**10,8**
	35	2,0	1,0	5,2	2,3	1,3	1,0	0,5	0,7	2,2	1,3	1,2	1,2	0,7	1,7	2,0	1,0	1,3	1,0	1,5	1,2	0,5	1,0	1,0	1,5	**34,2**
	36	1,0	0,3	0,5	0,3	0,2	0,9	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,7	0,9	1,2	0,6	0,6	0,4	0,3	0,4	**34,9**
	37	0,9	0,6	0,2	1,0	0,2	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,6	0,6	0,8	0,4	0,2	1,1	1,0	0,4	0,9	1,0	1,2	0,9	1,0	1,0	0,7
	38	0,6	0,6	1,4	0,6	0,5	0,6	0,7	0,5	0,9	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,5	0,5	1,8	0,5	0,5	0,7	0,7	0,5	0,6	0,6	0,7
	39	2,1	0,6	1,6	1,0	0,9	0,8	0,9	0,9	0,6	1,4	0,8	0,6	0,7	2,8	0,8	0,9	0,8	0,5	0,8	0,6	0,6	0,4	0,8	0,5	**38,8**
	40	1,4	0,4	0,8	0,7	0,6	0,8	1,0	0,5	0,3	0,3	0,4	0,3	0,6	0,6	0,8	0,7	0,6	0,4	0,6	0,3	0,3	0,8	0,5	0,1	**10,6**
	41	9,3	3,6	7,4	0,7	1,1	4,1	1,3	0,3	1,7	2,6	1,9	9,8	5,9	2,3	4,6	2,4	1,6	1,9	1,8	5,1	1,8	4,2	1,6	1,5	**26,6**
T2D	42	1,1	0,5	1,0	0,4	0,7	0,5	0,1	0,1	0,2	0,8	0,3	0,3	1,1	0,9	0,7	1,0	0,6	0,8	3,0	0,9	1,3	0,7	0,8	1,6	**15,5**
	43	1,4	1,3	2,4	1,3	1,3	2,1	0,1	0,1	0,2	1,5	1,9	1,9	2,3	2,3	2,3	1,5	1,9	2,0	3,0	3,8	3,0	2,4	2,5	2,5	**15,5**
AK+																										
KP																										
T1D>1J																										
T1D-EM																										

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. B. O. Böhm* für die interessante Aufgabenstellung und die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, Anregungen und, soweit notwendig, Diplomatie.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn *Prof. Dr. Fehling* der Abteilung Immunologie sehr dankbar.

Frau *Dr. Durinovic-Belló* sei für die Chance und die Unterstützung gedankt, meinen im Studium bevorzugten Weg in der Zoologie abzuschließen und zur Humanbiologie wechseln zu können.

Nicht versäumen will ich, mich bei Herrn *Dr. B. Manfras* der Abteilung Innere Medizin III zu bedanken, der mir zu jeder Zeit bei der Planung und Durchführung jeglicher Art von Versuchen mit Rat und Tat beiseite stand und von dem ich in den letzen Jahren sehr viel gelernt habe.

Mein Dank gilt auch der Firma *Roche Diagnostics*, Penzberg, für die Ermöglichung eines dreimonatigen Aufenthalts. Allen voran möchte ich dabei Herrn *Dr. J. Endl*, danken. Er hat mich in die große Kunst der Zell-Kultivierung eingewiesen und war mir stets ein sehr ideenreicher Diskussionspartner.

Herrn *Stevanovic* sei für die Durchführung der computersimulierten Bindungsaffinitäten der hier verwendetetn Peptide gedankt. Für die vielen Peptid-Synthesen möchte ich mich bei Herrn *Dr. Kalbacher* und Herrn *Dr. Deeg* sehr herzlich bedanken.

Bei Herrn *Dr. Sascha Dahouk* möchte ich mich ganz herzlich bedanken, der durch seine häufige und vor allem sponatene Unterstützung einen wesentlichen Beitrag für das Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Viele von meinen Mitarbeitern sind meine Freunde geworden, wobei ich vor allem *Aniela Grünzig, Angelika Kurkhaus*, *Silvia Rathmann*, *Martina Riedl* und *Jutta Schwarz* danken möchte, nicht nur für Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit, sondern auch für die netten „Sozialabende", die hoffentlich weitergeführt werden.

Erwähnen möchte ich natürlich auch an dieser Stelle stellvertretend für alle Mitarbeiter und Stipendiaten des Graduiertenkollegs „Diagnostische und therapeutische Konzepte in der molekularen Biologie" Herrn *Prof. Dr. F. Lehmann-Horn* und Herrn *Dr. Schiebe* und mich für die konstruktive Zusammenarbeit während meines Stipendiums herzlich bedanken.

Ein sehr herzlicher Dank gilt auch meiner *Schwester Heike Seefried* und meinen Freunden, allen voran *Nicole Glöggler, Anna Hinz* und *Simone Löffler*, die mir in einer schweren Phase immer wieder zu neuen Kräften verholfen haben und ohne die ich die letzten Monate sicherlich nicht so gut durchgestanden hätte.

Zuletzt gilt mein größter Dank meinen *Eltern*, die vor allem beim Korrekturlesen und bei der Verköstigung während des Zusammenschreibens, sowie durch die umfangreiche Unterstützung vor der Prüfung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.